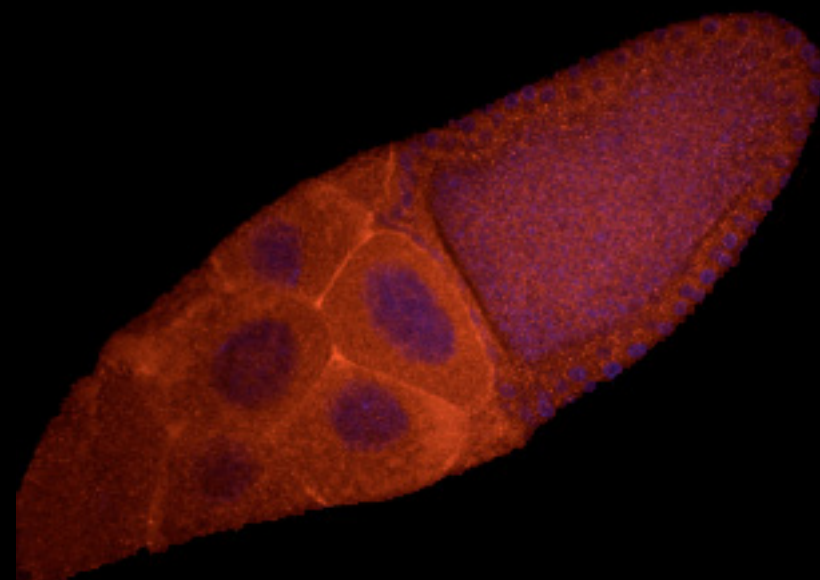
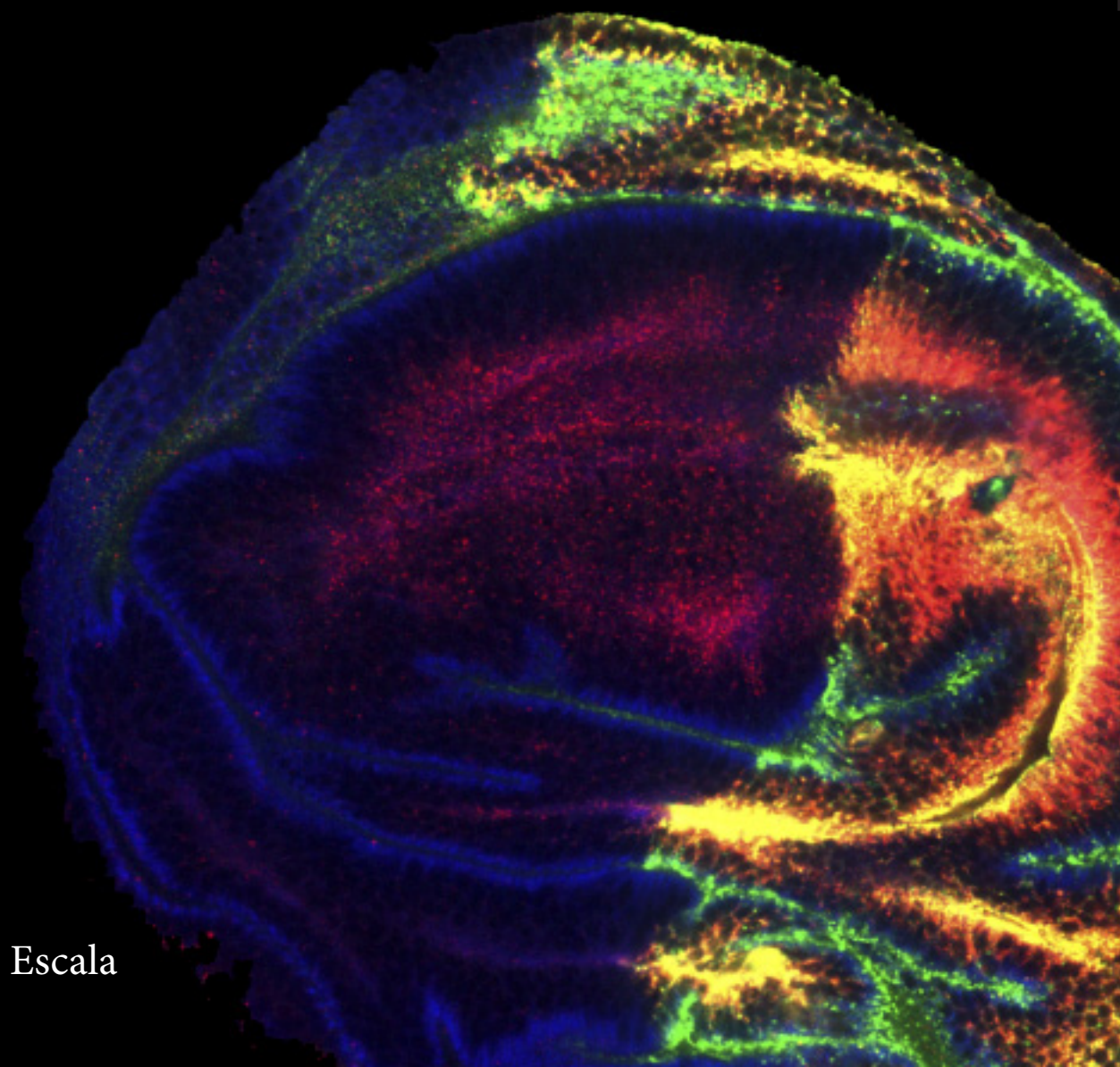


David Vaquero Escala

# FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS LIOPHORIN RECEPTOR 1 Y LIOPHORIN RECEPTOR 2 DE DROSOPHILA MELANOGASTER EN EL METABOLISMO LIPÍDICO



FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS LIOPHORIN RECEPTOR 1 Y LIOPHORIN RECEPTOR 2 DE DROSOPHILA MELANOGASTER EN EL METABOLISMO LIPÍDICO





**Fotografía de portada.** Disco imaginal de ala de *Drosophila melanogaster* en los cuales se ha sobreexpresado la isoforma Lpr1H con la línea *hh-Gal4*, donde se observa la expresión del LTP en rojo, el receptor en verde y el contorno celular en azul.

**Fotografía de contraportada.** Ovario de *Drosophila melanogaster* en los cuales se ha sobreexpresado la isoformas Lpr2E en un número pequeño de células marcadas en verde por la expresión de GFP (clones), usando para ello la línea *act<y<Gal4*. En rojo está marcado el LTP.

**Fotografía de canto.** Ovario de *Drosophila melanogaster* donde se observa la acumulación del LTP (rojo) y los núcleos celulares (azul).



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

# **FUNCION DE LAS PROTEINAS LIOPHORIN RECEPTOR 1 Y LIOPHORIN RECEPTOR 2 DE DROSOPHILA MELANOGASTER EN EL METABOLISMO LIPIDICO**

Memoria presentada por David Vaquero Escala

Director de Tesis: Dr. Joaquim Culí Espigul.  
Tutor: Manuel Muñoz Ruiz

SEVILLA, 2011

# ***ÍNDICE***

<b>ABREVIATURAS.</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>12</b>
1. Generalidades sobre metabolismo de los lípidos neutros.	14
2. Transporte de lípidos en el organismo.	17
3. Metabolismo de las lipoproteínas ricas en TAG.	19
3.1. Lipólisis de las lipoproteínas ricas en TAG en los microcapilares.	23
3.2. Fraccionamiento energético.	27
4. <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo.	29
5. Metabolismo en <i>Drosophila</i> .	32
5.1 Metabolismo lipídico durante el desarrollo de <i>Drosophila</i> y conservación evolutiva.	32

6. Estructura y metabolismo de las lipoproteínas en insectos y comparación con los mamíferos.	34
7. La superfamilia de las proteínas grandes transportadoras de lípidos (LLTP).	37
8. Los receptores de lipoforinas y su función en el metabolismo de lípidos neutros.	39
<b>OBJETIVOS.</b>	<b>48</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>51</b>
<b>RESULTADOS.</b>	<b>71</b>
1. Búsqueda de proteínas involucradas en la toma de lípidos en <i>Drosophila</i> .	73
1.1. Análisis de transportadores de ácidos grasos y lipasas.	73
1.2. Búsqueda de proteínas que interaccionan físicamente con los receptores de lipoforinas.	79
2. Caracterización del gen CG15828.	87
2.1 Validación de la interacción entre Lpr2E y el LTP mediante experimentos de pull-down.	88

2.2 Patrón de expresión de apoLTP y distribución de la proteína.	89
2.3 Generación de mutantes de falta de función para el gen apoLTP.	94
2.4 Caracterización funcional del LTP en <i>Drosophila</i> . Fenotipos de falta de función de la apo LTP.	99
2.5 Relevancia funcional de la interacción LTP- Receptores de lipoforinas.	101
2.6 La concentración de LTP en la hemolinfa no parece estar regulada por mecanismos de Retroalimentación.	110
2.7 Mapeo de los dominios proteicos de los receptores de lipoforinas necesarios para la interacción LTP-Lpr2E.	112
<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>118</b>
1. Identificación de la Lipid transfer Protein (LTP), una nueva lipoproteína en <i>Drosophila</i> .	120
2. Interacción de los Receptores de lipoforinas con el LTP. Significado biológico.	128



5. Modelo de interacción LTP-receptores de lipoforina en la toma de lípidos.	129
--	-----

<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>133</b>
----------------------	------------

<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>138</b>
----------------------	------------

# *Abreviaturas*



ADN	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
ADNc	<i>ADN copia</i>
ARN	<i>Ácido ribonucleico</i>
ARNi	<i>Ácido ribonucleico interferente</i>
ARNm	<i>ARN mensajero</i>
BDSC	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>
BSA	<i>Albúmina de suero bovino</i>
CE	<i>cholesterol esters</i>
CM	<i>chylomicron</i>
DAG	<i>Diacylglycerol</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato</i>
Df	<i>Deficiencia</i>
EDTA	<i>Ácido etilendiaminotetraacético</i>
FATP	<i>fatty acid transport protein</i>
FB	<i>Fat Body</i>
FFA	<i>Free fatty acid</i>

Flp	<i>Flipasa recombinasa</i>
FRT	<i>Flipase Recombination Target</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycan</i>
Ig	<i>Inmunoglobulina</i>
kDa	<i>kiloDalton</i>
LD	<i>Lipid droplet</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LPL	<i>Lipoprotein lipase</i>
<i>lpr1</i>	<i>Lipophorin receptor 1</i>
<i>lpr2:</i>	<i>Lipophorin receptor 2</i>
LTP	<i>Lipid transport protein</i>
<i>MTP</i>	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>
NR	<i>Nile Red</i>
OR	<i>OregonR</i>

PAGE	<i>Electroforesis en gel de poliacrilamida</i>
pb	<i>pares de bases</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PBT	<i>Phosphate Buffer Saline + Triton X100</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PL	<i>Phospholipids</i>
PMSF	<i>Phenylmethysulfonyl fluoride</i>
rpm	<i>revoluciones por minuto</i>
SDS	<i>Dodecilsulfato sódico</i>
TAG	<i>Triacylglycerol</i>
TAP	<i>Ttandem affinity purification</i>
Tris	<i>Trishidroximetilaminometano</i>
UAS	<i>Upstream activation sequence</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
VDRC	<i>Vienna Drosophila Research Collection</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>

wt

*wild type*

# ***INTRODUCCIÓN***





## **1. Generalidades sobre el metabolismo de los lípidos neutros.**

Químicamente, los lípidos son macromoléculas de carácter hidrofóbico, solubles en compuestos orgánicos tales como el benceno o el cloroformo. Los lípidos desempeñan funciones biológicas muy relevantes, tales como constituir una reserva energética, actuar de intermediarios en diferentes rutas de señalización o como componentes estructurales de las membranas celulares. En particular, los lípidos sirven como una fuente de energía a largo plazo para ser utilizados en períodos de inanición así como para mantener actividades de gran desgaste energético tales como el vuelo de los insectos. Al ser los lípidos insolubles en medio acuoso su transporte a través del sistema circulatorio acuoso de un animal requiere de mecanismos especializados mediante la formación de lipoproteínas. Durante esta tesis nos vamos a centrar en los mecanismos de transporte de los lípidos de reserva en el organismo y su adquisición celular.

La energía metabólica se almacena principalmente en forma de triacilglicerol (TAG), un tipo de lípidos formados por una molécula de glicerol con sus tres grupos hidroxílicos esterificados por tres ácidos grasos, ya sean saturados o insaturados (figura 1). El TAG es una molécula hidrofóbica y pequeña con una alta densidad energética. Su hidrofobicidad le permite ser almacenadas intracelularmente en grandes cantidades sin interferir en el metabolismo normal de la célula (Farese and Walther, 2009).

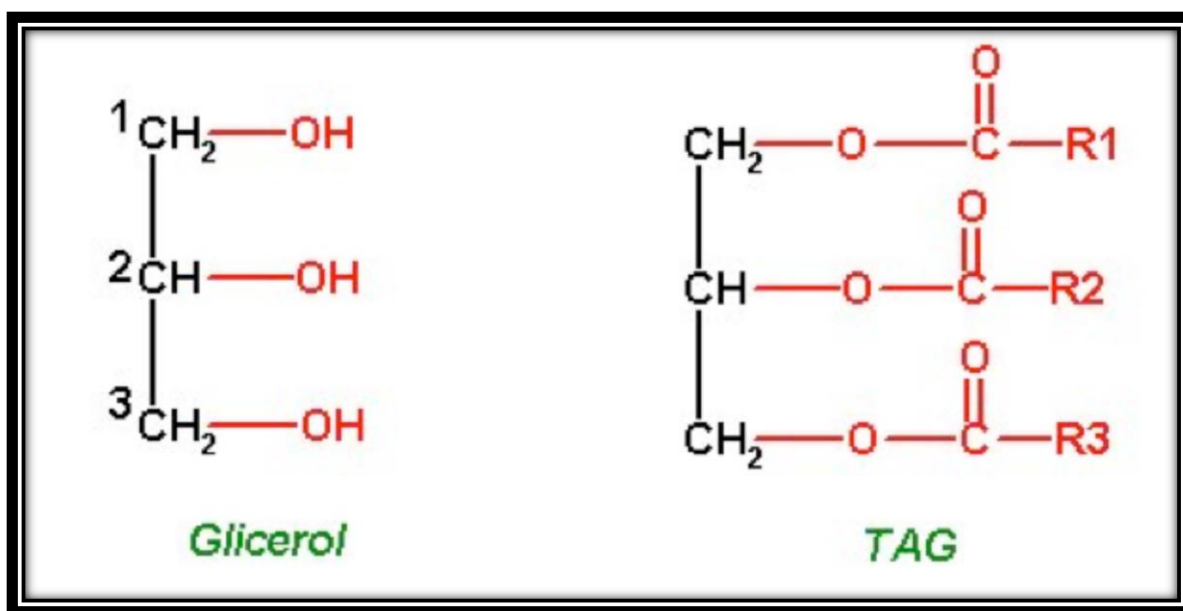


Figura 1: Esquema de la estructura del glicerol y de los triacilglicéridos, donde las R indican ácidos grasos.

En las células, el TAG se almacena en unos orgánulos llamados inclusiones lipídicas (LD por sus siglas en inglés, Lipid Droplets). Los LD están presentes en la mayoría de células eucariotas y en *Drosophila*, en todos los estadios del desarrollo (Parisi et al., 2011). Los LD están formados por una monocapa de fosfolípidos que rodea un núcleo de lípidos neutros, en el cual destacan ésteres de colesterol y TAG. En su superficie, se encuentran gran número de proteínas relacionadas con la biología de los LD como la Perilipina, que fue la primera que se describió después de ser aislada de adipocitos de rata (Greenberg et al., 1991). Otras proteínas presentes en la superficie de los LD y que dirigen tanto la acumulación de lípidos como su lipólisis son la Diacilglicerol aciltransferasa 2 (DGAT2), Rab18, la Triglicérido lipasa adiposa (ATGL) o la Lipasa sensible a hormonas (HSL) (figura 2). Los procesos de síntesis y almacenamiento de los diferentes lípidos están regulados por hormonas y por distintas rutas de señalización (figura 3). Por ejemplo, se ha descrito como la vía de la insulina controla el tamaño de los LD a través de la regulación de la

Perilipina LSD2 (Vereshchagina and Wilson, 2006).

Figura 2: Estructura y composición de las inclusiones lipídicas. La imagen superior muestra una inclusión lipídica mediante microscopía electrónica. La imagen inferior muestra la composición de una inclusión lipídica, donde el núcleo está compuesto por TAG y ésteres de colesterol; rodeando al núcleo se encuentra una capa de fosfolípidos y esteroides y en la superficie se localizan diferentes proteínas como DGAT2, Rab18 y perilipinas. (Farese and Walther, 2009)

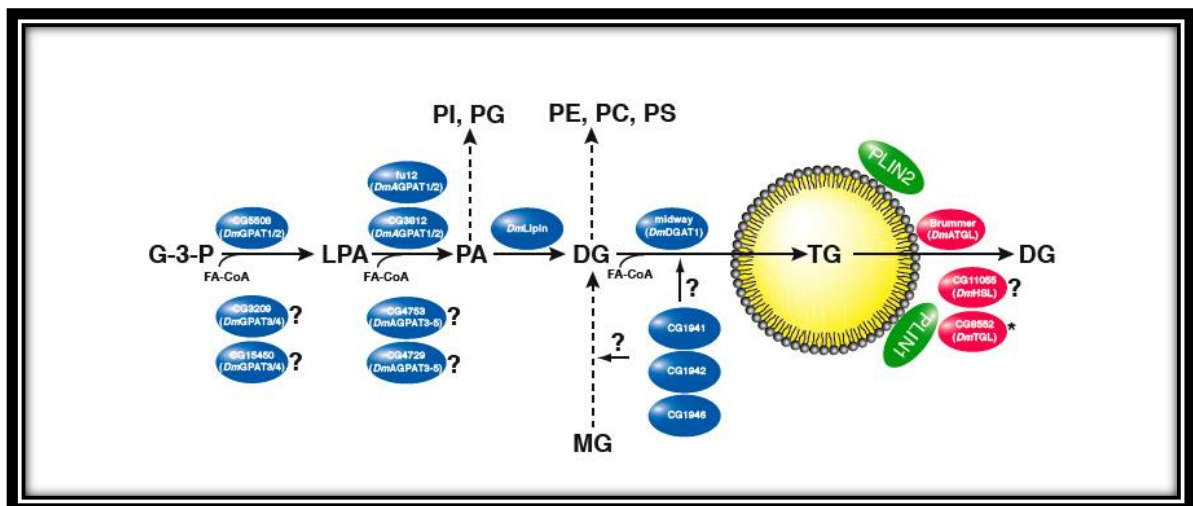
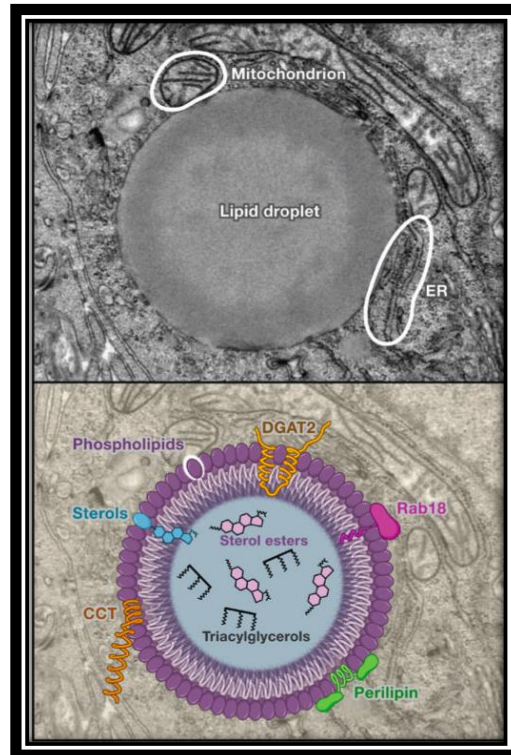


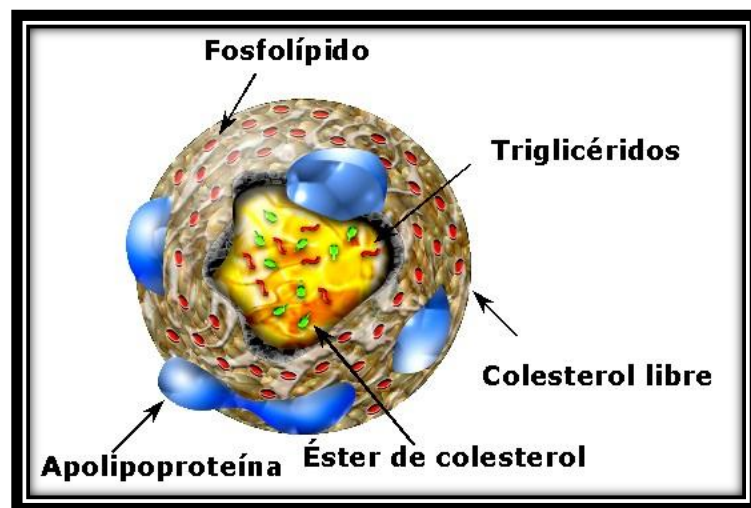
Figura 3: Síntesis y movilización del TAG en las inclusiones lipídicas en *Drosophila*. Esquema donde se representan las enzimas lipogénicas de la vía del glicerol-3-fosfato (azul), lipasas (rojo) y proteínas moduladoras de las inclusiones lipídicas asociadas a la familia de la Perilipina (verde). (Kuhnlein, 2012)

## 2. Transporte de lípidos en el organismo.

El sistema circulatorio, al ser un medio líquido, es ideal para transportar sustancias hidrofílicas como la glucosa, los aminoácidos, las sales y otras sustancias solubles. Sin embargo, a la hora de transportar sustancias hidrofóbicas tales como los lípidos, se necesitan mecanismos especiales que aumenten su solubilidad. Esto se consigue mediante la formación de partículas lipoproteicas llamadas lipoproteínas.

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares compuestos por proteínas y lípidos, cuya función es la de transportar las grasas por todo el organismo. Estas lipoproteínas tienen una forma esférica y están formadas por una capa exterior de 20 nm de grosor formada por colesterol no esterificado y fosfolípidos principalmente que rodea un núcleo interior compuesto de lípidos apolares (colesterol esterificado y triglicéridos) (figura 4). Las proteínas que forman parte de las lipoproteínas se llaman apolipoproteínas y se encuentran en la superficie del núcleo lipídico. Son esenciales para la formación, estabilidad y función de las lipoproteínas. Las apolipoproteínas dirigen sus regiones apolares hidrófobas hacia el interior y sus grupos cargados hidrofílicos hacia el exterior, donde interaccionan con el agua.

Figura 4: Composición y estructura de las lipoproteínas. Las lipoproteínas son complejos macromoleculares compuestos de un núcleo de lípidos apolares (colesterol esterificado y triglicéridos) cubiertos con una capa externa polar formada a su vez por apoproteínas, fosfolípidos y colesterol libre.



A pesar de que las características relevantes de las lipoproteínas como su ensamblaje, la estructura, el metabolismo y la interacción con sus receptores vienen determinadas por sus componentes apolipoproteicos, las lipoproteínas de los mamíferos se han clasificado tradicionalmente basándose ya sea en su densidad hidratada o en su movilidad electroforética. Según su densidad, que depende principalmente del contenido relativo de proteínas y lípidos, las lipoproteínas se clasifican en quilomicrones (CM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Los CM tiene sólo un 1-2 % de proteína mientras que las HDL tiene aproximadamente el 50 % en peso de proteína, las VLDL tiene alrededor de un 10% y las LDL rondan el 30%. Los diámetros de las lipoproteínas están inversamente correlacionados con sus densidades y van desde alrededor de 6000 Å de los CM a los 70 Å para el HDL, pasando por los 600 Å del VLDL y los aproximadamente 250 Å del LDL (figura 5).

Estas distintas clases de lipoproteínas clasificadas según su densidad se corresponden con funciones biológicas distintas. Los CM son sintetizados en el intestino para el transporte de triglicéridos de la dieta al resto de tejidos. Los VLDL se sintetizan en el hígado y se encargan de exportar los triglicéridos endógenos, mientras que las LDL se derivan de la transformación metabólica de las VLDL en la circulación. La función de los LDL es entregar ésteres de colesterol a los tejidos periféricos y al hígado. Los HDL son sintetizados y ensamblados en el hígado y en el intestino o se forma a partir de las transformaciones metabólicas de otras lipoproteínas en la circulación y de los lípidos celulares en las membranas celulares. Los HDL eliminan el exceso de colesterol de las células y lo transportan al hígado y a los tejidos esteroideogénicos para su metabolismo o excreción. En resumen, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) están implicadas principalmente en el transporte de colesterol, mientras que los quilomicrones (CM) y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) transportan principalmente TAG (fielding, 2008).

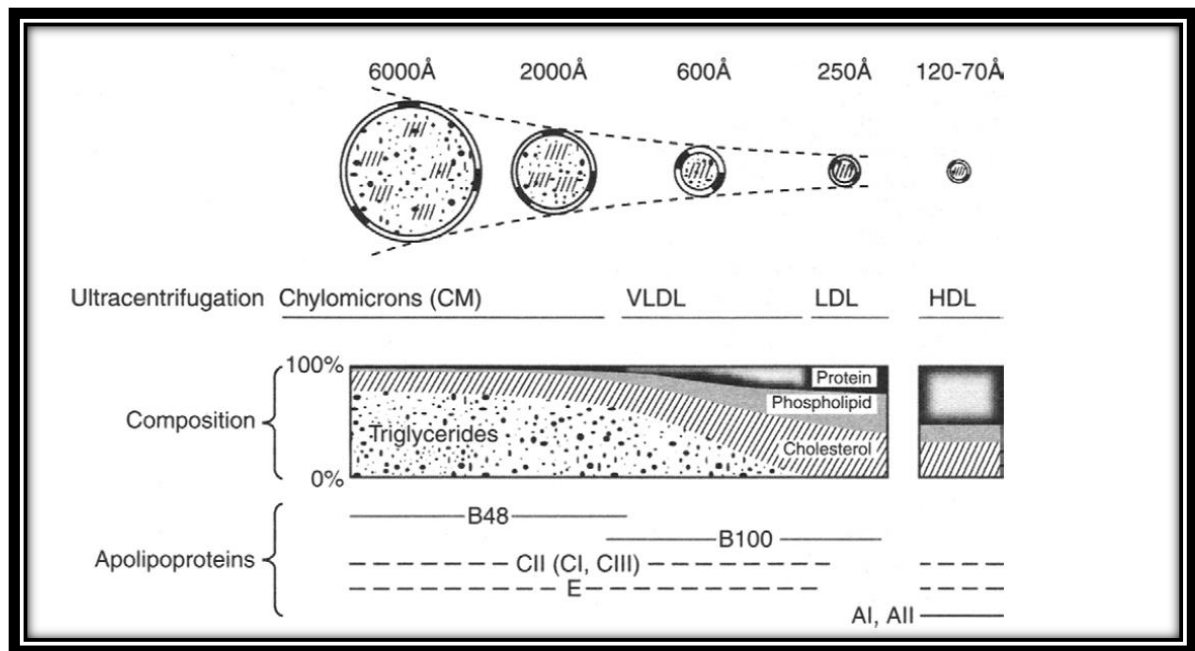


Figura 5: Estructura, tamaño y composición de las diferentes lipoproteínas. Según su densidad se pueden dividir en CM, VLDL, LDL y HDL. Su tamaño oscila entre los 6000 Å de los CM, hasta los 70 Å de los HDL. La capa externa de todas las lipoproteínas está compuesta por apolipoproteínas, colesterol y fosfolípidos. El núcleo interno contiene triacilglicerol y ésteres de colesterol principalmente. CM y VLDL tienen el contenido mayor de triacilglicerol y sólo el 10% de su peso son apolipoproteínas mientras que LDL y HDL contienen principalmente ésteres de colesterol en sus núcleos y el 50% de su peso son apolipoproteínas. Las principales apolipoproteínas presentes en varias clases de lipoproteínas son indicadas con líneas continuas; apolipoproteínas presentes en menor proporción son indicadas con líneas discontinuas (Jonas, 2008).

Las apolipoproteínas determinan en gran parte las propiedades y funciones de las lipoproteínas. Su función común es ayudar a solubilizar los lípidos neutros en el plasma. Las apolipoproteínas se unen fácilmente a la interfaz agua-fosfolípidos y, bajo condiciones apropiadas, pueden formar espontáneamente partículas discretas con fosfolípidos (Jonas, 2008). Las apolipoproteínas que se encuentran en el plasma se clasifican en dos tipos generales: las apolipoproteínas no intercambiables y las intercambiables (o solubles). ApoB100 y ApoB48 son las principales apolipoproteínas no intercambiables presentes en el LDL, VLDL y CM. Estas proteínas son muy grandes e insolubles en agua. Se ensamblan junto con los lípidos en su sitio de

síntesis, el retículo endoplasmático de las células del hígado (VLDL) o del intestino (CM). Estas apolipoproteínas no intercambiables circulan unidas siempre a la misma partícula de lipoproteína a pesar de las varias transformaciones metabólicas en el plasma que puedan sufrir, hasta que son eliminadas, como lipoproteínas, a través de receptores específicos. Por otro lado, las apolipoproteínas intercambiables (por ejemplo ApoA1, ApoA2, ApoC, ApoE) tienen masas moleculares más pequeñas que la ApoB100 o ApoB48, tienen solubilidades en agua limitada en sus estados delipidados y pueden transferirse entre diferentes lipoproteínas mientras están en la circulación (fielding, 2008).

### **3. Metabolismo de las lipoproteínas ricas en TAG.**

Las enfermedades cardiovasculares son actualmente la principal causa de muerte en todo el mundo. Se ha visto que valores elevados de triglicéridos en plasma son un factor de riesgo para estas enfermedades (Nordestgaard et al., 2007), de aquí el interés creciente en el estudio del metabolismo de las lipoproteínas ricas en TAG.

El metabolismo de las lipoproteínas ricas en TAG tiene dos vías: una exógena y otra endógena. La exógena es principalmente responsable de la absorción de las grasas dietarias y su distribución a los tejidos, mientras que la vía endógena transporta colesterol y triglicéridos desde el hígado a los tejidos en condiciones de ayuno. En ambos casos el TAG llega a los tejidos periféricos, donde se utilizan como fuente de energía, entrando en el ciclo de la  $\beta$ -oxidación, o se almacenan en los adipocitos (fielding, 2008).

El punto de partida en la **vía exógena** son las grasas hidrolizadas de la dieta, las cuales son internalizadas por los enterocitos mediante transportadores de ácidos grasos y también por simple difusión pasiva. Los enterocitos tienen en la zona apical expuesta a la luz intestinal las denominadas microvellosidades, cuya función es incrementar la superficie intestinal para facilitar así la absorción



de los nutrientes. Por otro lado, la zona basal del epitelio intestinal se encuentra muy vascularizado, facilitándose la transferencia de los nutrientes al torrente circulatorio y linfático. En los enterocitos, los ácidos grasos libres (FFA por sus siglas en inglés) son re-esterificados en TAG y junto con los ésteres de colesterol procedentes del colesterol de la dieta y fosfolípidos sintetizados en el propio intestino, son empaquetados formando CM, cuya principal apolipoproteína es la isoforma B48 de la Apolipoproteína B (ApoB). La síntesis de los CM sigue una ruta vesicular, es decir que son transferidos desde el retículo endoplasmático, donde se ensamblan, al Golgi mediante vesículas específicas (vesículas transportadoras de los CM) para finalmente ser descargados al espacio intercelular a través de la membrana plasmática. La síntesis de los CM requiere de la actividad de la Microsomal TAG-transfer protein (MTP), una proteína que se localiza en el retículo endoplasmático. Una vez los CM son secretados al sistema linfático, entran a la circulación mayor por medio de la vena cava para ser distribuidos por todos los tejidos. Ya en la circulación, los CM también incorporan en su superficie colesterol, el cual es transferido desde HDL circulantes, y otras apolipoproteínas, como la ApoCII, un cofactor que estimula la actividad de la lipoproteína lipasa (fielding, 2008). Una vez en los capilares del tejido adiposo y muscular, el TAG de los CM se hidroliza por acción de la lipoproteína lipasa produciendo ácidos grasos libres y glicerol que pueden ser tomados por las células (ver más adelante). El remanente del CM termina siendo endocitado y eliminado rápidamente por el hígado gracias a receptores de la familia Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR), o directamente por la interacción con los HSPGs (Bishop et al., 2007; Bishop et al., 2008; Mahley and Ji, 1999)(figura 7). Estos remanentes tienen potencial de formar ateromas, lesiones focales características de la aterosclerosis que se inician en la capa íntima de las arterias y provocan la acumulación de LDL (lipoproteína de baja densidad) en la pared de la arteria.

Por otro lado, la **vía endógena** transporta colesterol y triglicéridos a los tejidos cuando el organismo está en ayuno. Esta vía se inicia con la síntesis y secreción en el hígado de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), ricas en

TAG. Al igual que los CM, la síntesis de VLDL requiere de la acción de la proteína MTP. Una vez el VLDL llega a los microcapilares de los tejidos periféricos, el TAG que contiene se hidroliza por la acción de la lipoproteína lipasa, generándose partículas de mayor densidad, el LDL. Estas lipoproteínas, muy aterogénicas, contienen principalmente colesterol, transportándolo a los tejidos que lo requieren (gónadas, glándulas adrenales y células con alta tasa de división). Parte del LDL es captado por el hígado a través de receptores LDL y degradado (figura 6).

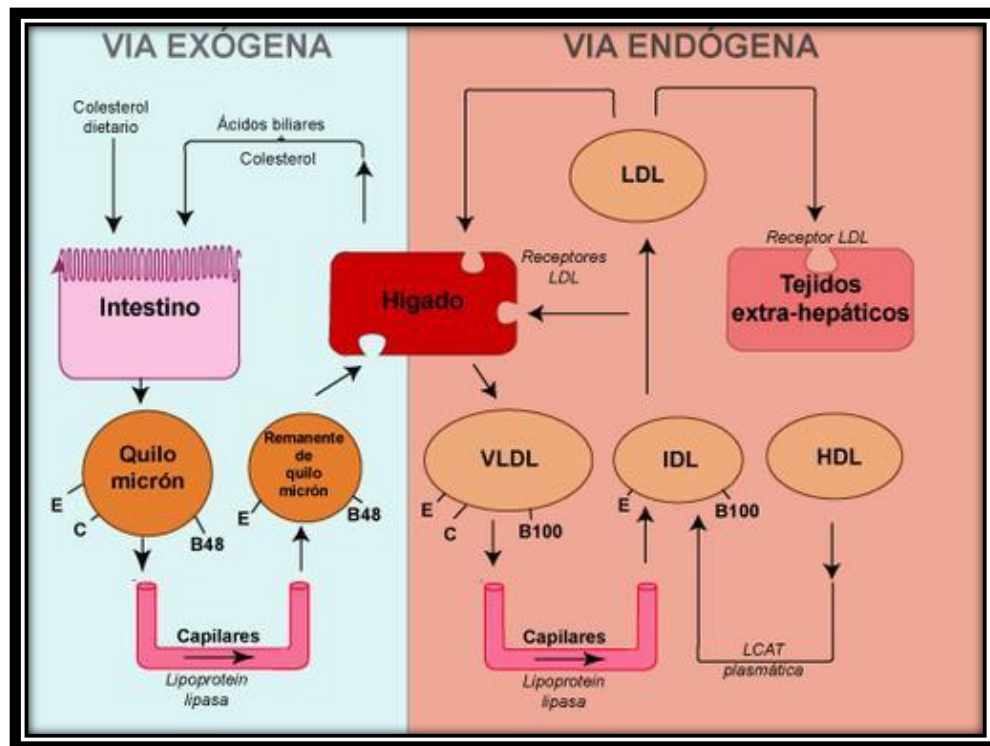


Figura 6: Esquema del metabolismo de las lipoproteínas ricas en TAG donde se observan las dos vías del metabolismo de las lipoproteínas: la exógena y la endógena. Ambas rutas se caracterizan por la lipoproteína encargada del transporte de TAG. Quilomicrones en el caso de la ruta exógena y VLDL en la ruta endógena. En ambos casos el TAG es transportado por el plasma hasta los tejidos periféricos, donde se utilizan como fuente de energía, entrando en el ciclo de la  $\beta$ -oxidación, o se almacenan en los adipocitos. (fielding, 2008).

### **Lipólisis de las lipoproteínas ricas en TAG en los microcapilares:**

La transferencia del TAG presente en los CM y VLDL a las células de los tejidos periféricos se inicia en los microcapilares periféricos del corazón, músculo y tejido adiposo sin que ocurra endocitosis de las lipoproteínas. Una enzima clave en este proceso de la que ya hemos hablado es la lipoproteína lipasa (LPL), que media la hidrólisis del TAG de estas lipoproteínas (fielding, 2008), (Bensadoun, 1991; Goldberg and Merkel, 2001; Williams, 2008)(tabla 1). De hecho, se ha visto que algunos pacientes que padecen quilomicronemia tienen una rara mutación de pérdida de función en la LPL, si bien esta enfermedad puede tener también otras causas (Dallinga-Thie et al., 2010).

La LPL se sintetiza en las células del tejido parenquimal, como son adipocitos y cardiomiocitos para después ser translocada a sitios de unión funcionales en la superficie luminal de las células endoteliales. La forma activa de la LPL es un homodímero (con orientación cabeza-cola) cuya formación en el retículo endoplasmático requiere de una chaperona especializada, la lipase maturation factor 1 (LMF1). A este proceso se le conoce como maduración de la lipasa (Peterfy et al., 2007) (Osborne et al., 1985). Mutaciones en LMF1 tanto en ratón como en humano causan una hipertriglicemia severa ya que su actividad se requiere también para la maduración de las lipasas hepática y endotelial (Peterfy et al., 2007). En la superficie luminal de los capilares, la LPL se une principalmente a los heparan sulfatos proteoglicanos (HSPG) (Braun and Severson, 1992; Wang and Eckel, 2009). Los HSPG se localizan en isletas de lípidos de la membrana plasmática. Su carga negativa favorece su interacción tanto con las lipoproteínas ricas en TAG como con la LPL (Goldberg, 1996; Parthasarathy et al., 1994; Sendak et al., 1998). Es interesante destacar que los HSPG están conservados evolutivamente (Eugster et al., 2007).

•Tipos de lipasas según su plegamiento  $\alpha/\beta$

- Neutras
- Ácidas
- Lipasa 2
- Lipasa 3
- GDSL
- Lipasa sensible a hormonas (HSL, por sus siglas en inglés, Hormone sensitive lipase)

**TABLA 1:** Las lipasas de todos los organismos se pueden dividir en 6 familias, las cuales se separan por su plegamiento  $\alpha/\beta$ . Estas 6 familias son las lipasas neutras, ácidas, lipasa 2, lipasa3, GDSL y HSL (Derewenda, 1994) (Holmquist, 2000). Todas las familias usan los mismos mecanismos de reacción en dos pasos, basado en una triada catalítica de residuos (normalmente Ser-His-Asp/Glu) que genera un sistema de transferencia de carga y una serina altamente nucleofílica. De las 56 lipasas de *Drosophila*, una pertenece a la familia HSL (lipasa sensible a hormonas, por sus siglas en inglés), una pertenece al grupo de la Lipasa 3 y ninguna al de la Lipasas 2. La mayoría pertenecen a las familias de lipasas ácidas (21) y neutras (31). Este criterio de separación en familias se basa en el plegamiento  $\alpha/\beta$  de las lipasas.

Las lipoproteínas circulantes ricas en TAG pueden interaccionar con los HSPG del endotelio de los microcapilares, resultando entonces accesibles a la LPL la cual media la hidrólisis del TAG liberando ácidos grasos libres (FFA). Estos FFA son internalizados de forma activa por las células endoteliales gracias a receptores de membrana como el scavenger receptor CD-36 y la FATP1. CD-36 es una proteína de superficie con dos regiones transmembrana (Tao et al., 1996). Muestra capacidad endocítica pero también está involucrada en la toma de lípidos. Se vio que ratones nulos para CD-36 mostraban una reducción en la adquisición de ácidos grasos por las células del corazón, tejido adiposo y músculo (Coburn et al., 2000). Otros ensayos han mostrado que tiene un papel importante en la toma de lípidos por parte de las células del intestino y especialmente de ácidos grasos de cadena muy larga (Drover et al., 2008). Por otro lado, el transportador de ácidos grasos FATP1 es una proteína asociada a la membrana plasmática con una región transmembrana y con actividad Acil-CoA sintetasa (Lewis et al., 2001). Se ha observado que en ratones knock-down para FATP1 se reduce drásticamente la capacidad de internalizar ácidos grasos de cadena larga (Lobo et al., 2007). Sin embargo, los mecanismos por los que

FATP1 media la internalización de ácidos grasos al interior de las células no están totalmente esclarecidos.

Los FFA son finalmente transferidos a las células del parénquima (adipocitos o miocitos) en las que se re-esterifican y son usados para almacenamiento o para generar energía directa gracias al proceso de  $\beta$ -oxidación mitocondrial, un proceso catabólico de los ácidos grasos en el cual sufren la eliminación de un par de átomos de carbono hasta que el ácido graso se descompone por completo en forma de moléculas de acetil-CoA, que serán posteriormente oxidados en energía química en forma de ATP.

Se han identificado varios moduladores de la función de la LPL in vivo. Uno de estos efectores de gran importancia es la apolipoproteína CII (ApoCII), la cual, como hemos mencionado anteriormente, se incorpora a los CM y VLDL una vez éstos están en circulación, principalmente desde las HDL y es esencial para la actividad de la LPL. Se han identificado cuatro mutaciones del gen ApoCII, todas ellas generan una severa quilomicronemia (Franssen R and ES., 2008). Otro modulador de la actividad de la LPL son las Angiopoietin-like Proteins 3 y 4 (ANGPTL 3 y 4), inhibidores de su actividad. El incremento en los niveles de ANGPTL lleva a un aumento en plasma de los niveles de TAG (Sonnenburg et al., 2009; Sukonina et al., 2006). En consonancia con su papel como un inhibidores, se ha observado una rara mutación de falta de función en la ANGPTL4 en individuos con bajos niveles de TAG en plasma (Romeo et al., 2009). Finalmente, un componente clave en la hidrólisis de las lipoproteínas ricas en TAG descubierto recientemente es la Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein binding protein 1 (GPIHBP1), requerida para la transcitosis de la LPL desde la superficie basal de las células endoteliales al lumen de los microcapilares. Ratones *Gpihbp1*<sup>-/-</sup> padecen una severa quilomicronemia (Beigneux et al., 2007). Asimismo, se han identificado pacientes con mutaciones en GPIHBP1 que igualmente sufren de quilomicronemia, demostrándose la importancia de esta proteína en la lipólisis mediada por LPL en humanos (Beigneux et al., 2009).

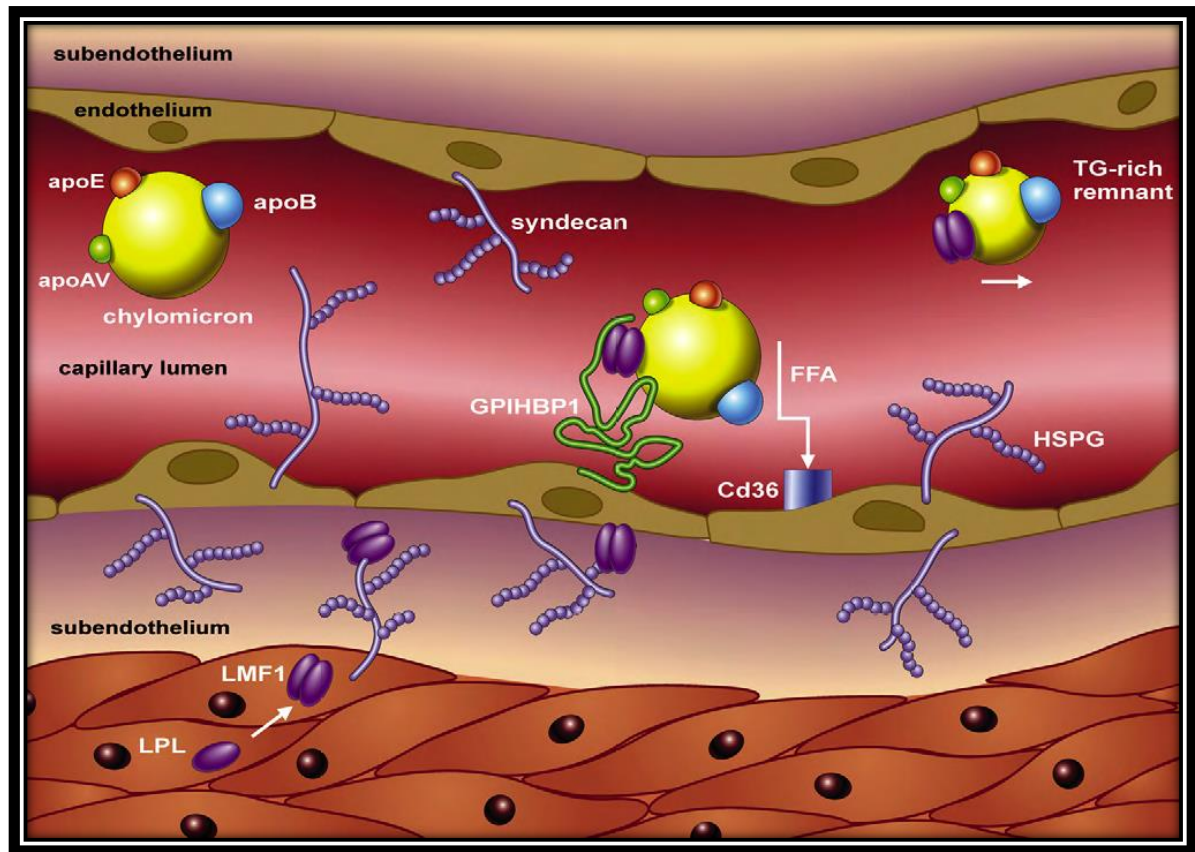


Figura 7: Esquema de la toma de lípidos en el endotelio vascular de mamíferos. Lipoproteína lipasa (LPL) es sintetizada por la células parenquimales, madurada por la proteína LMF1, transportada y secretada al espacio subendotelial, una vez allí se une a los heparan sulfato proteoglicanos (HSPG). La LPL atraviesa las células del endotelio vascular mediante transcitosis un proceso en el que tiene interviene el receptor de VLDL (VLDLR), hasta alcanzar la superficie luminal del vaso donde está presente GPIHBP1, probablemente localizada en *lipid rafts* junto con syndecan1 y a un transportador de ácidos grasos como CD36. GPIHBP1 interacciona con las lipoforinas que contienen TAG y la LPL, favoreciendo la hidrólisis de TAG y la liberación de ácidos grasos. Los ácidos grasos libres serán internalizados en las células endoteliales gracias a la acción de CD36.

### Fraccionamiento energético:

Un aspecto importante del metabolismo energético es el fraccionamiento energético, es decir, los distintos destinos o almacenamientos que seguirán las

grasas procedentes de la dieta una vez que entran en el organismo. Una proteína relevante en este proceso es la LPL, que como hemos visto anteriormente tiene un papel fundamental en la lipólisis extracelular de las lipoproteínas ricas en TAG en los capilares de los tejidos periféricos y en la adquisición de lípidos. La transcripción de la LPL no es igual en todos los tejidos, siendo especialmente elevada en el corazón y los músculos. Ello probablemente determine aquellos tejidos en los que mayoritariamente se produce la toma de lípidos, como lo sugieren estudios realizados en ratones en los que la expresión de la LPL se manipulaba en diferentes tejidos. Por ejemplo, la eliminación de la LPL en el corazón produce hipertrigliceridemia (Augustus et al., 2006). Así mismo, se ha visto que la sobreexpresión de la LPL tanto en el corazón como en los músculos produce una disminución de los niveles de TAG en plasma y una disminución en la acumulación de TAG en el tejido adiposo. Es interesante que estos ratones son resistentes a la obesidad inducida por dietas ricas en grasas (Weinstock et al., 1995).

Otra proteína muy relevante en el fraccionamiento energético descubierta recientemente es el factor de crecimiento del endotelio vascular B (VEGF-B, por sus siglas en inglés) que junto con el VEGF-A regulan la fisiología de los vasos sanguíneos. El VEGF-B se expresa fuertemente en tejidos en los cuales se produce una importante actividad oxidativa y que emplean ácidos grasos como principal fuente energética, como son el corazón, músculo esquelético y tejido adiposo marrón. El VEGF-B induce la expresión de los FATP en el endotelio, incrementando por tanto la toma de ácidos grasos desde el lumen de los microcapilares y que son posteriormente transferidos a los tejidos subyacentes para su uso en las mitocondrias (Hagberg et al., 2010). Así, se ha visto que los ratones mutantes para *vegfb* presentan un fenotipo de obesidad, dado por un bajo consumo de lípidos en el corazón, músculo esquelético y tejido adiposo marrón. Esta reducción en la toma de lípidos no está causada por una disminución de la incorporación de grasas procedentes de la dieta en el intestino, la cual ocurre normalmente, sino que viene determinado por el cambio que se produce en el destino de los lípidos absorbidos, los cuales se acumulan

en el tejido adiposo blanco en lugar de ser consumidos en los tejidos periféricos (Hagberg et al., 2010).

#### **4. *Drosophila melanogaster* como organismo modelo.**

Alteraciones del metabolismo lipídico son responsables de una fracción creciente de problemas de salud pública como las enfermedades coronarias o el síndrome metabólico. Ello ha llevado a un mayor interés en comprender los mecanismos de regulación del metabolismo lipídico tanto en condiciones normales como en la enfermedad. Este tipo de estudios básicos puede beneficiarse enormemente del uso de organismos modelo como *Drosophila*. Los insectos se estudian por varias razones. En primer lugar tienen un ciclo de vida corto y un tiempo de generación rápido permitiendo a los científicos llevar a cabo una variedad de manipulaciones en un corto período de tiempo. Además, se han secuenciado los genomas de varios insectos y en el caso de *Drosophila*, existen mutantes disponibles en casi cualquier locus genético. Tal facilidad en la manipulación genética aumenta la capacidad de los investigadores para analizar sus hipótesis y encuadrarlas en sus contextos fisiológicos y genéticos. Además, un número elevado de procesos fisiológicos y del desarrollo se hallan conservados evolutivamente entre los insectos y los organismos superiores, incrementando su utilidad como organismos modelo (Soulages and Wells, 1994).

En particular, el uso de la mosca del vinagre, *D. melanogaster*, como modelo animal de experimentación tiene varias ventajas técnicas como son un tiempo de generación corto, gran prole, relativamente baja complejidad génica (unos 14000 genes) y fundamentalmente el desarrollo de técnicas genéticas muy sofisticadas que le dan una ventaja sobre otros organismos experimentales. La mayoría de la información acumulada a lo largo de ocho décadas de utilización de *D. melanogaster* como organismo modelo se halla disponible en bases de datos que son compartidas por la comunidad científica. Además, el alto grado de conservación de las secuencias de los genes entre *Drosophila* y otros organismos como los humanos, ha aumentado



significativamente su utilización como modelo experimental en estudios biomédicos.

*Drosophila* es un insecto holometábolo (que lleva a cabo una metamorfosis completa), cuyo ciclo de vida es de alrededor de 15 días a 25°C. Su duración puede variar en moscas mutantes y con los cambios de temperaturas (por ejemplo, a 18°C su duración se duplica). Una hembra puede depositar entre 100-400 huevos que eclosionan a las 24 horas, dando larvas que se alimentan y crecen por 5 días durante los cuales sufren 3 mudas sucesivas. Posteriormente forman un pupario en el que se encapsulan y sufren una metamorfosis que dura aproximadamente unos 5 días luego de la cual emergen las moscas adultas. Éstas tienen una expectativa de vida de alrededor de 50 días (figura 8). Los machos eclosionados están maduros sexualmente casi de inmediato, mientras que las hembras permanecen vírgenes por unas 8 horas (a 25°C) después de eclosionar; lo que permite aislarlas antes de que sean inseminadas.

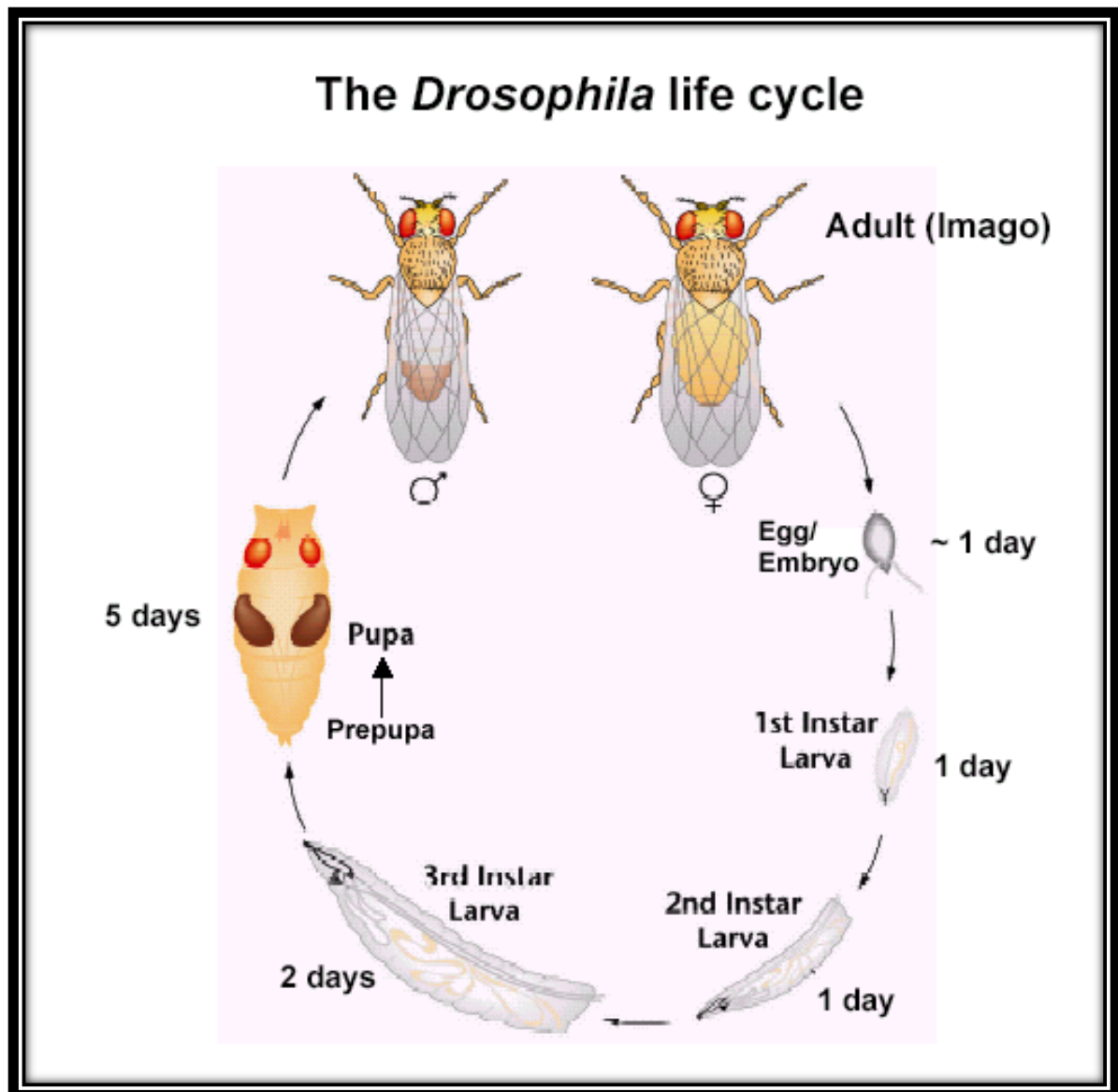


Figura 8: Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

La mayor parte del cuerpo de la mosca adulta se origina a partir de los discos imaginales larvarios. Por ejemplo, el disco imaginal del ala de *Drosophila* es un saco epidérmico que se encuentra cerca de la cabeza de la larva, el cual durante la metamorfosis se desarrollará para formar el ala y el notum de la mosca adulta. El disco imaginal de ala se origina en el ectodermo embrionario en forma de grupo de unas 30 células que proliferan de manera extensiva durante el desarrollo larval, para llegar hasta alrededor de 50.000 células al final de la vida larvaria. Durante la pupación hay ya muy poca proliferación celular

pero se producen profundos cambios en la forma de las células de manera que el disco imaginal se va transformando en una ala adulta.

## **5. Metabolismo en *Drosophila***

### **Metabolismo lipídico durante el desarrollo de *Drosophila* y conservación evolutiva.**

*Drosophila* comparte la mayoría de las funciones metabólicas básicas con los vertebrados. Mantiene unos niveles apropiados de azúcares en la hemolinfa, compensando las condiciones ambientales cambiantes y almacenando el exceso de energía en forma de glucógeno y lípidos en el cuerpo graso. Estas reservas se movilizan durante los períodos de necesidad energética, como el vuelo o si se agota el alimento (Rusten et al., 2004; Scott et al., 2004; Wigglesworth, 1949). Muchos de los sistemas de órganos que controlan la absorción de nutrientes, el almacenamiento y el metabolismo en los seres humanos tienen análogos en la mosca de la fruta. Así por ejemplo, diferentes grupos de células en insectos mantienen la homeostasis de carbohidratos de una manera análoga a las células  $\alpha$  y  $\beta$  pancreáticas (Lee and Park, 2004; Rulifson et al., 2002).

Durante la ovogénesis las moscas de la fruta sintetizan numerosos LD en las células nutricias de la cámara del huevo. Estos LD son finalmente transferidos al oocito en las últimas fases de la ovogénesis para proporcionar energía al embrión en desarrollo. Un almacenamiento subóptimo de los lípidos suministrados por vía materna o una movilización defectuosa de éstos provoca la parada del desarrollo y la muerte del embrión (Gronke et al., 2005; Teixeira et al., 2003). Más avanzado el desarrollo, las tres etapas larvarias están dedicadas principalmente a la alimentación y a la acumulación de masa corporal, de manera que se almacenan grandes cantidades de lípidos en el cuerpo graso. Las células del cuerpo graso contienen numerosos LDs de tamaño variable que representan la más importante acumulación de energía calórica del organismo

en desarrollo (Kuhnlein, 2011). Posteriormente, durante el desarrollo pupal el cuerpo de la mosca es reestructurado, produciéndose una descomposición e histólisis de muchos tejidos y su reemplazamiento por los tejidos imaginales que en la larva se hallan en proliferación y diferenciación. Ello inicia una fase de movilización de TAG con una reducción de casi tres veces en la grasa corporal durante la metamorfosis (Church and Robertson, 1966). Durante la metamorfosis, se disgrega el cuerpo graso larvario y la mayoría de sus células mueren por apoptosis. Algunas células del cuerpo graso larvario llegan a formar parte del animal adulto, pero son eliminadas durante los primeros días posteriores a la eclosión (Nelliot et al., 2006). A partir de este momento en adelante la gran mayoría de los LD se almacenan en la cuerpo graso adulto y están sujetos a la acumulación y movilización de TAG en respuesta a la conducta de alimentación discontinua de la mosca.

La digestión y la absorción de nutrientes se producen en el intestino medio de *Drosophila*, el equivalente funcional del estómago y el intestino. El cuerpo graso actúa como el hígado y el tejido adiposo blanco de los mamíferos, metabolizando los nutrientes y almacenando importantes reservas de glucógeno y de lípidos. Grupos especializados de células de *Drosophila*, los oenocitos, acumulan lípidos al iniciarse un período de inanición y se ha propuesto que realizan funciones similares a las de los hepatocitos en el procesamiento de los lípidos (Gutierrez et al., 2007). Se ha visto que los oenocitos son claves en la síntesis de hidrocarburos y de ácidos grasos de cadena muy larga. Los hidrocarburos son un grupo importante de lípidos que actúan como feromonas y también como componentes impermeabilizantes de la cutícula (Parvy et al., 2012) (Piek, 1964) (Diehl, 1975; Fan, 2003).

Una diferencia importante entre el metabolismo lipídico de los mamíferos y de insectos es la incapacidad de éstos para sintetizar colesterol, siendo auxótrofos para este compuesto (Gilbert et al., 2002). Es importante destacar sin embargo, que ello no impide utilizar *Drosophila* para analizar aspectos del metabolismo del colesterol. En particular, se han establecido modelos en *Drosophila* para el estudio de la enfermedad de Niemann Pick tipo C (Griffin et

al., 2004). Esta enfermedad consiste en un déficit del transporte lisosomal de colesterol a lo largo de la vía endocítica, acumulándose el colesterol en los lisosomas.

## **6. Estructura y metabolismo de las lipoproteínas en insectos y comparación con los mamíferos.**

Como hemos visto en secciones anteriores, en mamíferos existen varios tipos de lipoproteínas para el transporte de lípidos (CM, VLDL, LDL, HDL) y varias apolipoproteínas (ApoB48, ApoB100, ApoA1, etc.). Por el contrario, los insectos como *Drosophila melanogaster* cuentan con una única lipoproteína, más versátil, llamada lipoforina (figura 9). La lipoforina es una partícula esférica de entre 450 a 600 KDa, compuesta de lipoproteínas y lípidos, en su mayoría fosfolípidos anfipáticos, DAG, esteroides e hidrocarburos. Las lipoforinas tienen una copia de cada una de las dos apolipoproteínas no intercambiables, Apolipoforina I (ApoLp-I) y Apolipoforina II (ApoLp-II) de peso molecular 240 y 75 kDa, respectivamente (Weers et al., 1993). Las dos apolipoproteínas derivan de un precursor común, la apolipoforina II/I (apoLp-II/I), debido a una escisión post-traducciona (Bogerd et al., 2000; Weers et al., 1993). Esta escisión es llevada a cabo por una furina en el aparato de Golgi, afectando a las funciones extracelulares de estas lipoproteínas (Smolenaars et al., 2005). Las lipoforinas se sintetizan en el cuerpo graso donde son parcialmente lipidadas y liberadas a la hemolinfa para su distribución por todo el cuerpo del insecto. Estudios fisiológicos establecieron que las lipoforinas actúan como transportadores de lípidos: toman lípidos en el intestino o cuerpo graso y lo ceden a células de tejidos periféricos tales como los tejidos musculares, para su catabolismo. Durante estos ciclos de transporte, se vio que la degradación de la apolipoproteína era mínima, sugiriendo que ésta se recicla repetidas veces

(Canavoso et al., 2001) (van der Horst et al., 2002). Además de transportar lípidos neutros y fosfolípidos, las lipoforinas también desempeñan un papel clave en el transporte de otras moléculas hidrofóbicas como los hidrocarburos implicados en la formación de la cutícula y que también pueden actuar como feromonas (Pho et al., 1996), hormonas lipídicas como la hormona juvenil y también participan en el transporte intercelular de morfógenos lipofílicos como Hedgehog y Wingless, contribuyendo a la formación de los gradientes de actividad de estas moléculas responsables del crecimiento y formación del patrón de los tejidos en desarrollo (Panakova et al., 2005).

Al contrario que en mamíferos, el transporte de lípidos exógeno (procedentes de la dieta) y el endógeno (sintetizado "de novo") está mediado por la misma lipoproteína, la lipoforina (Shapiro et al., 1988). Una vez se produce la ingesta, el TAG procedente de la dieta es hidrolizado por lipasas digestivas y los ácidos grasos resultantes son absorbidos por las células del intestino. Los enterocitos pueden resintetizar TAG que almacenan como LD de forma temporal (Palm et al., 2012). Sin embargo, al contrario que los mamíferos que mayoritariamente transportan TAG por la sangre en los CM y VLDL, en insectos los lípidos procedentes de la dieta se transportan principalmente en forma de DAG en las lipoforinas (Shapiro et al., 1988), a pesar de que el 98% de la reserva total de lípidos en insectos está en forma de TAG (Chino and Gilbert, 1964). Se desconoce el porqué de esta discrepancia. Una vez el DAG es sintetizado por las células del intestino, éste se transfiere a la lipoforina de la hemolinfa en un proceso que requiere de la Lipid Transfer Protein (LTP), una segunda lipoproteína circulante de muy alta densidad en *Drosophila* (Palm et al., 2012). En mamíferos, la movilización de reservas de lípidos para el suministro de energía durante las condiciones de ejercicio o de ayuno no depende exclusivamente del transporte por lipoproteínas sino que también ocurre mediante la síntesis y transporte de ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés) asociados a la albúmina del suero. Esto no ocurre en los insectos sino que también emplean las lipoforinas. En particular, la lipoforina que circula en la hemolinfa carga DAG adicional en el cuerpo graso. En algunos

insectos que tienen altos requerimientos energéticos durante el vuelo, como la langosta, simultáneamente a esta transferencia de lípidos se asocian reversiblemente con la partícula en expansión múltiples copias de apolipoproteína III (ApoLp-III), generándose lipoforinas de baja densidad y alto contenido en lípidos. ApoLp-III parece estar relacionada con los 22 kDa del extremo N-terminal de la apoE de mamíferos (Narayanaswami and Ryan, 2000; Ryan and van der Horst, 2000). Sin embargo, ApoLp-III no está presente en *Drosophila*. La asociación de la apolipoproteína intercambiable con la lipoforina (produciendo su forma de baja densidad LDLp) y el reciclaje de apoLp-III en la entrega selectiva de lípidos son muy similares a las interacciones extracelulares de las lipoproteínas ricas en TAG humanas con apoE (Curtiss and Boisvert, 2000).

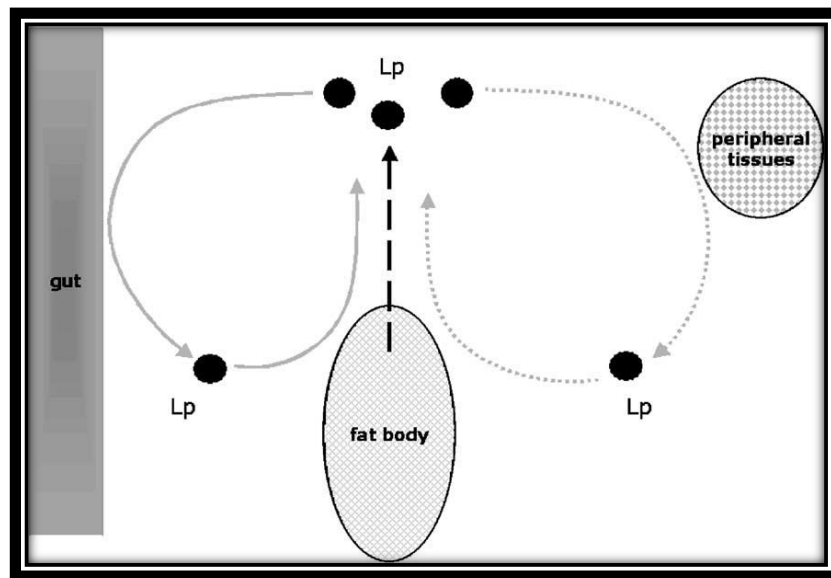


Figura 9: Esquema del Transporte de lípidos mediado por lipoproteínas en insectos. La flecha continua, representa la función de la Lp en la carga de lípidos en el intestino y la entrega de los lípidos en el cuerpo graso; la flecha de línea de puntos, la función de la Lp de cargar lípido en el cuerpo graso y la entrega en los tejidos periféricos; y la flecha discontinua, la biosíntesis y secreción de la Lp (Rodenburg and Van der Horst, 2005)

## **7. La superfamilia de las Proteínas Grandes Transportadoras de Lípidos (LLTP)**

Las lipoproteínas de insectos pertenecen a la familia de las proteínas grandes transportadoras de lípidos (Large Lipid Transport Proteins, LLTP), las cuales incluyen la vitelogenina, la proteína microsomal transportadora de triglicéridos (MTP, por sus siglas en inglés) y la apolipoproteína B de mamíferos (Babin et al., 1999; Mann et al., 1999; Segrest et al., 1999; Segrest et al., 2001). Las proteínas de la familia LLTP comparten un dominio N-terminal grande (dominio LLTP) de aproximadamente 900 aminoácidos que contiene un bolsillo de unión a lípidos que muy probablemente, actúa para almacenar lípidos o transferirlos al núcleo de la partícula lipoproteica (Babin et al., 1999; Manchekar et al., 2004; Mann et al., 1999; Richardson et al., 2005; Segrest et al., 1999; Smolenaars et al., 2005).

La homología en secuencia y estructura entre ApoLp-II/I y ApoB se extiende más allá del dominio N-terminal (figura 10). El extremo C-terminal de ApoB100 contiene una zona grande de asociación de lípidos, la cual está compuesta por dos dominios anfipáticos en hebra  $\beta$  y dos dominios anfipáticos en hélice  $\alpha$ , ordenados siguiendo un patrón alternante ( $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ ) (Segrest et al., 2001; Segrest et al., 1994; Segrest et al., 1998). ApoLp-II/I contiene también una zona de asociación a lípidos consistente en un dominio anfipático en lámina  $\beta$  y otro en hélice  $\alpha$ , dispuestos en el mismo orden ( $\beta$ - $\alpha$ ). En el extremo C-terminal, apoLp-II/I contiene además un dominio von Willebrand de función desconocida (Bogerd et al., 2000). La multiplicidad de estos dominios en las apolipoproteínas no parece estar relacionado con el tamaño de las partículas. Así el VLDL, que contiene Apo B100, es menor en tamaño que los CM, que contienen Apo B48, una forma truncada de Apo B100 que se produce por edición de su ARNm y contiene sólo un dominio anfipático en lámina  $\beta$  y un pequeño dominio en  $\alpha$  hélice (Davidson and Shelness, 2000). Basándose en esto, apoLp-II/I se asemeja más a apoB48 que a apoB100; aun así, la lipoforina es entre 5–50 veces más pequeña en tamaño que los VLDL o los CM (Schumaker et al., 1994).



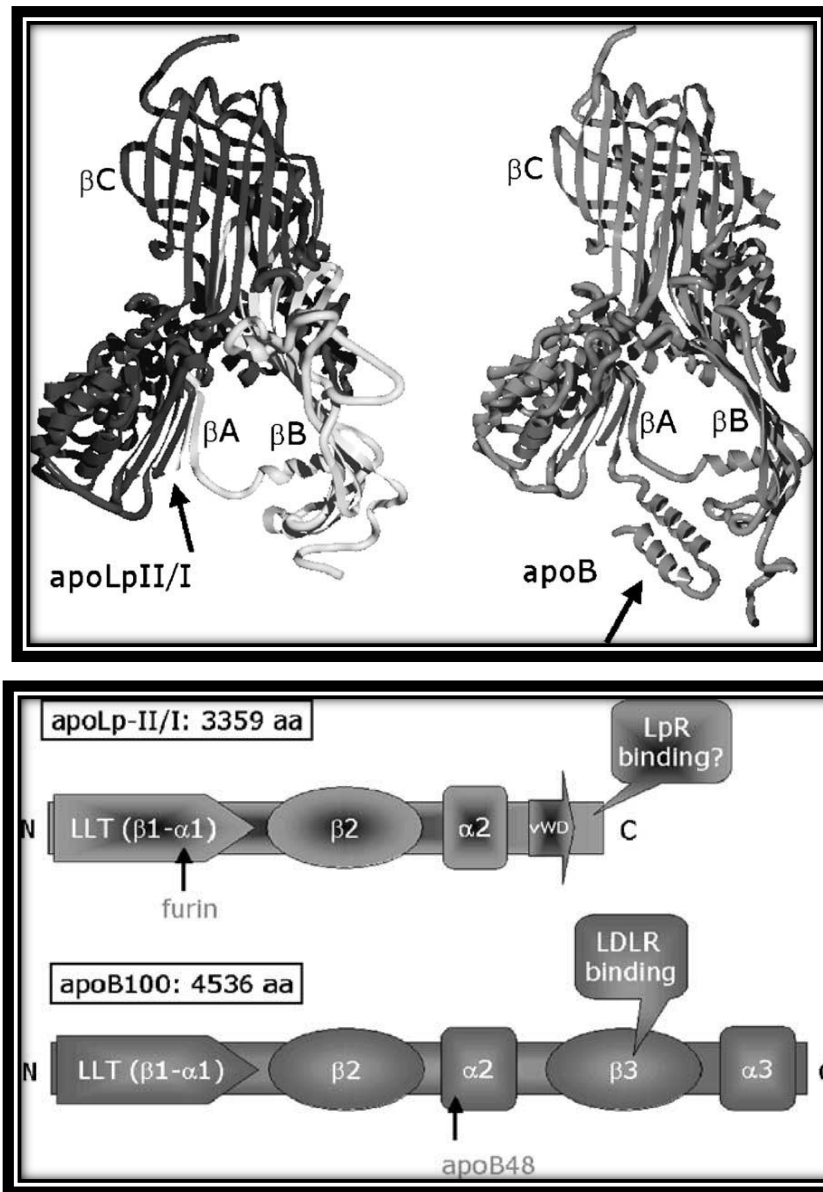
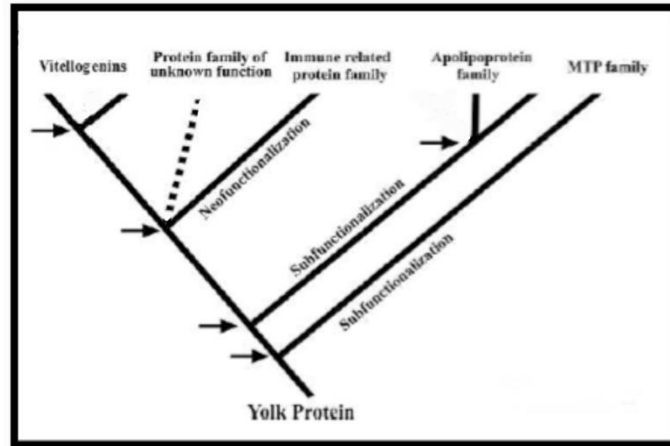


Figura 10: Estructura tridimensional del módulo LLT de apoLp-II / I de Locusta migratoria y apoB humana (imagen superior). Organización estructural de la apoLp-II / I de Locusta y la apoB100 humana.

La familia LLTP es una familia de proteínas muy versátiles, entre sus funciones incluyen la circulación de lípidos, la reproducción y respuesta inmune.

Todas las proteínas de esta familia han evolucionado a partir de una proteína Yolk similar a la actual vitelogenina (figura 11) (Wu et al., 2013). La característica principal de esta familia, como hemos mencionado antes, es el módulo LLT, el cual es el encargado de unir los lípidos para su posterior uso en función del miembro de la familia.

Figura 11: Modelo evolutivo de las proteínas de la familia LLTP. Observamos como al principio de la evolución de una proteína YOLK similar a la actual Vitelogenina se separa la familia MTP y APO otorgándole a estas familia la capacidad de circularización de lípidos (Wu et al., 2013).



## **8. Los receptores de lipoforinas y su función en el metabolismo de los lípidos neutros.**

Los receptores de lipoforinas pertenecen a la gran familia de receptores de LDL, los cuales son glicoproteínas endocíticas transmembrana caracterizadas por un dominio extracelular grande y un pequeño dominio intracelular poco conservado entre los distintos miembros de la familia. En el dominio intracelular existen uno o más motivos NPXY que actúan como sitios de unión para proteínas adaptadoras con dominios de unión a fosfotirosina y actúan de señal para la endocitosis (Hussain et al., 1999; May and Herz, 2003). El ectodominio de estas proteínas está compuesto de repeticiones ricas en cisteína y dominios YWTD que forman una estructura en  $\beta$  propeller (Herz and Bock, 2002), y que en el caso del LDLR están relacionados con la liberación del ligando inducida por el bajo pH del compartimento endosomal. Además de

compartir la misma estructura proteica, se ha visto que todas las proteínas LDLR requieren de la chaperona especializada Boca para su correcta biosíntesis (Culi and Mann, 2003). Concretamente Boca actúa como chaperona para el correcto plegamiento del dominio proteico  $\beta$  propeller presente en todas las proteínas de la familia de LDLR (Culi et al., 2004).

Se ha demostrado que los LDLR son fundamentales para la captación celular de ligandos extracelulares como lipoproteínas, proteasas, inhibidores de proteasas, hormonas y vitaminas unidas a sus moléculas transportadoras etc. y sirvieron como modelo general para describir el proceso de endocitosis mediada por receptor (Brown and Goldstein, 1979). Distintos receptores de la familia LDLR también participan en procesos de transducción de señal, y además regulan procesos biológicos incluyendo metabolismo de lípidos, vitaminas y hormonas. Son también esenciales durante la embriogénesis, el desarrollo del sistema nervioso y la regulación de la densidad ósea. Todos los miembros de la familia LDLR están presentes en el sistema nervioso central y regulan procesos claves de su fisiología.

La familia de proteínas LDLR se originó en las etapas tempranas de la evolución de los metazoos ya que se halla conservada en todos los organismos multicelulares examinados (May and Herz, 2003). Sin embargo, no está presente en los eucariotas unicelulares como las levaduras, indicando que no tienen relación con la división o la supervivencia de éstos (Herz and Bock, 2002). En mamíferos, esta familia consiste de nueve miembros que incluyen el propio LDLR, el receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLR), proteínas relacionadas con el LDLR (LRP1, LRP1b, LRP5 y LRP6), Megalin, el Receptor 2 de la apolipoproteína E (ApoER2) y MEGF7 (Hussain, 2001; Willnow, 1999). En la mosca de la fruta *D. melanogaster* encontramos siete representantes de la familia: Lipoprotein Receptor 1 y 2, LRP1, Megalin, Arrow, MEGF7 y Yolkless. De estos, sólo Yolkless no tiene un claro ortólogo en mamíferos (figura 12).

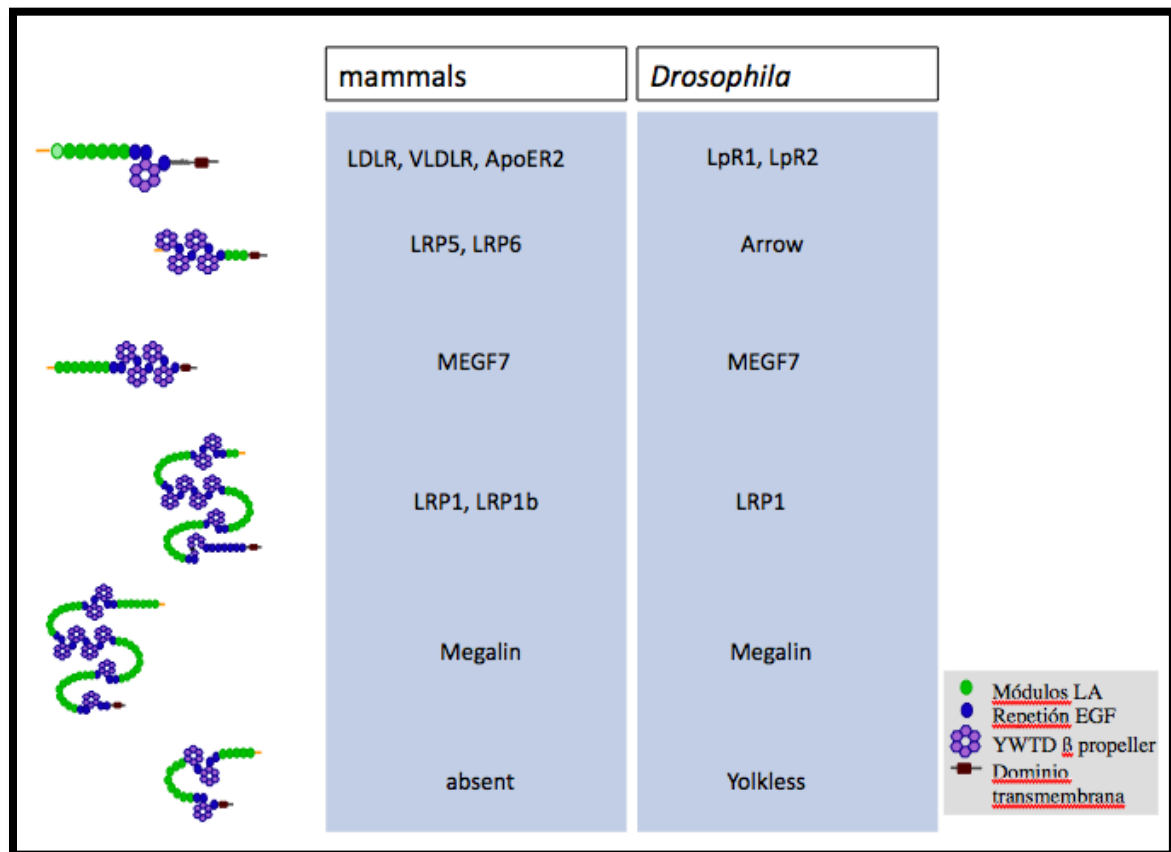


Figura 12: Representación de los miembros que componen la familia de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) en *Drosophila melanogaster* y sus ortólogos en mamíferos.

Estudios bioquímicos clásicos mostraron que la unión de la lipoforina a distintos tejidos como el cuerpo graso, los músculos o los ovarios de insectos, sigue una cinética compatible con la existencia de receptores específicos para las lipoforinas (Tufail and Takeda, 2009). Estos putativos receptores podrían por tanto ser importantes para la transferencia de lípidos entre las lipoforinas y los tejidos. Posteriormente, se clonó un receptor en *Locusta migratoria* perteneciente a la familia de los Low Density Lipoprotein Receptors con capacidad de endocitar lipoforinas en células transfectadas (Dantuma et al., 1999). Aun así, la relevancia funcional de este tipo de receptores no se evidenció hasta estudios más recientes realizados en nuestro laboratorio en los

que se identificaron dos genes de *Drosophila* pertenecientes a la familia LDLR y con alta homología al receptor de lipoforinas clonado anteriormente en *Locusta*. Estos dos genes, el *lipophorin receptor 1 (lpr1)* y *lipophorin receptor 2 (lpr2)*, se vio que eran críticos para la toma de lípidos en los discos imaginales y los oocitos (Parra-Peralbo and Culi, 2011). Las células de los discos imaginales contienen elevados niveles de TAG en inclusiones lipídicas intracelulares que desaparecen casi por completo en la *Df(3R) lpr1/2* (deficiencia que elimina los genes *lpr1* y *2*) (figura 13). De forma parecida, durante el periodo de vitelogénesis se acumula una gran cantidad de lípidos neutros en los oocitos como material de reserva. En los mutantes *Df(3R)lpr2* (deficiencia en la cual se elimina el gen *lpr2*), esta acumulación se reduce drásticamente, de manera que las hembras mutantes son estériles (Parra-Peralbo and Culi, 2011) (figura 13).

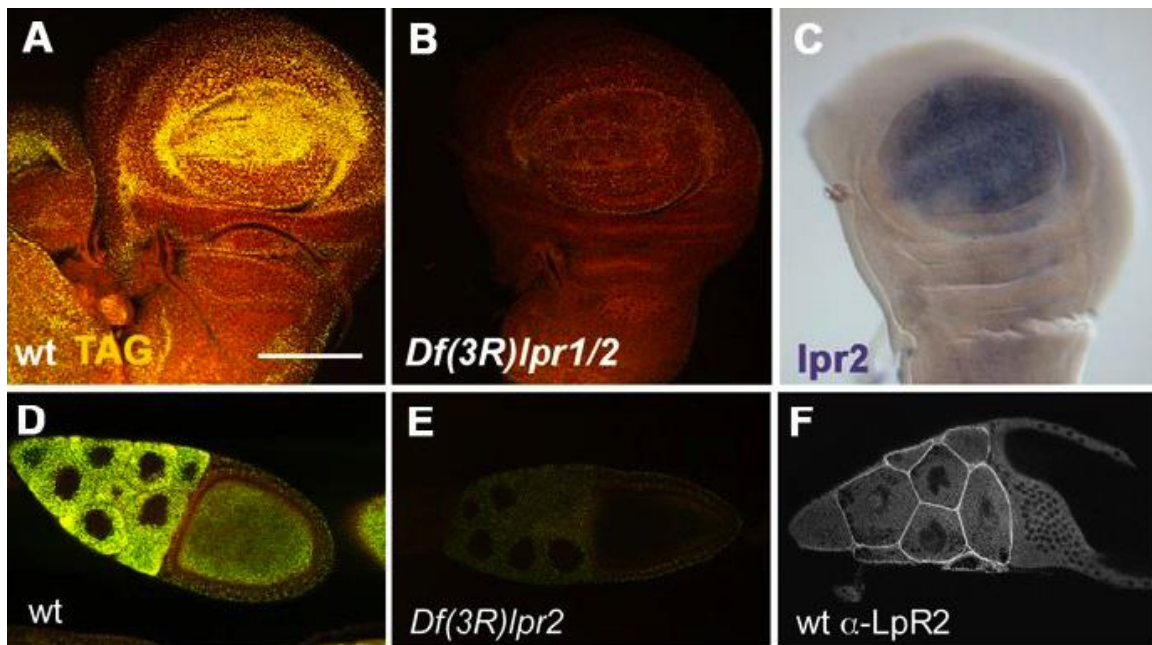


Figura 13: Imágenes de discos imaginales de ala y ovarios de *Drosophila* donde se observa la importancia de los genes *lpr1* y *lpr2* en la toma celular de lípidos neutros. A, B y C representan discos imaginales de ala y D, E y F folículos de estadio 10. (A y D) Tejidos silvestres mostrando la acumulación de lípidos neutros intracelulares, en amarillo. (B y E) Animales mutantes para los genes *lpr1* y *lpr2* (B) o *lpr2* (E), donde la toma de lípidos está muy reducida. (C y F) Expresión del gen *lpr2* en el disco imaginal de ala (hibridación in situ) y en los folículos (anticuerpo).

Los genes *lpr1* y *lpr2* son muy parecidos entre ellos y se transcriben en múltiples isoformas cada uno, resultantes de splicing alternativo y por el uso de dos promotores alternativos presentes en cada gen, un promotor proximal y promotor distal, concretamente existen 6 isoformas de *lpr1* y 5 de *lpr2* (Parra-Peralbo and Culi, 2011) (figura 14). El número y organización de los exones es muy similar entre ambos genes. Además, exones en posiciones equivalentes codifican dominios proteicos también equivalentes. Estas isoformas difieren fundamentalmente en tres características: la primera es el número y la identidad de los módulos LA, los cuales son esenciales para la toma de lípidos; la segunda es la presencia de una región de O-glicosilación rica en serina y treonina próxima al dominio transmembrana y la tercera es la presencia de un dominio N-terminal sin homología con otras proteínas (NCN, por sus siglas en inglés, non-conserved N-terminal domain) (figura 14).

Las proteínas *Lpr1* y *Lpr2* son homologas al LDLR humano y a otras proteínas de la familia LDLR conocidas por actuar como receptores endocíticos (Hussain et al., 1999; Strickland et al., 2002). Sin embargo, en contraste con la actividad del LDLR humano, las proteínas *Lpr1* y *Lpr2* no requieren la endocitosis de las lipoforinas para mediar la toma de lípidos neutros. Así, mutaciones en *rab5* o en el complejo adaptador AP-2, dos componentes esenciales de la vía endocítica, no afectan a la toma de lípidos durante la vitelogénesis. Además, la expresión dirigida de los receptores de lipoforinas tanto en los discos imaginales como en los folículos de genotipo *Df(3R)/lpr1/2*, media la acumulación de inclusiones lipídicas en células que expresan los receptores y también, de forma no autónoma, en las células adyacentes que no los expresan. Esto sugiere que los receptores de lipoforinas estimulan la toma de lípidos actuando a nivel extracelular. De hecho, la expresión de las isoformas de los receptores de lipoforinas capaces de mediar la toma de lípidos promueve la estabilización extracelular de las lipoforinas alrededor de las membranas basolaterales de las células del disco imaginal (figura 15). Esto no ocurre cuando se expresan las isoformas que no median la toma de lípidos, sugiriendo que la estabilización extracelular de las lipoforinas es un paso clave en el proceso de toma de lípidos

(Parra-Peralbo and Culi, 2011).

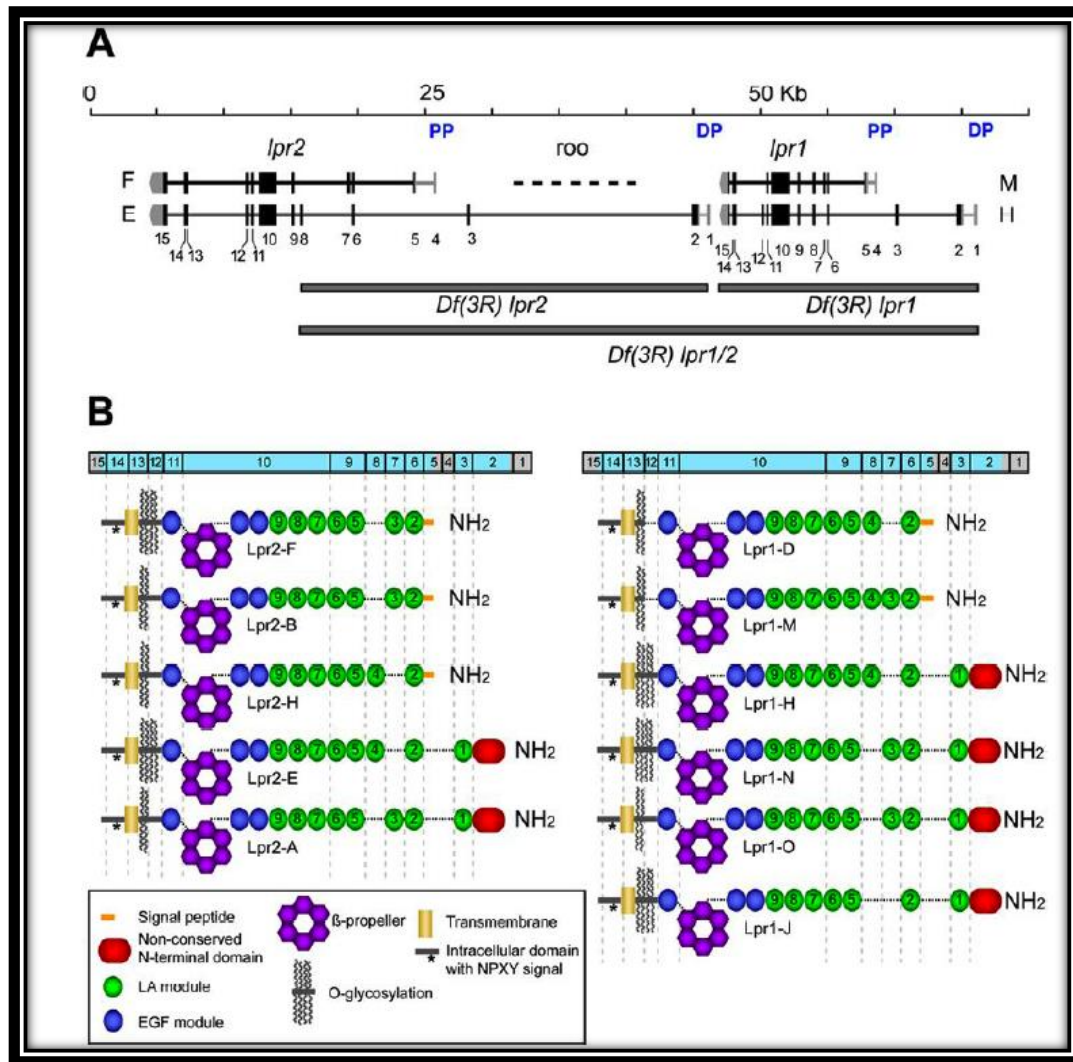


Figura 14: Esquema de la organización genómica de los genes *lpr1* y *lpr2* y sus diferentes isoformas. (A). Cada gen tiene dos promotores, un promotor distal (PD) y un promotor proximal (PP) que da lugar a que los genes *lpr1* y *lpr2* se transcriban en múltiples isoformas. Representación de las diferentes deficiencias que se representadas mediante líneas de color gris. (B) el uso de los dos promotores y el splicing alternativo da lugar a la formación de múltiples isoformas.



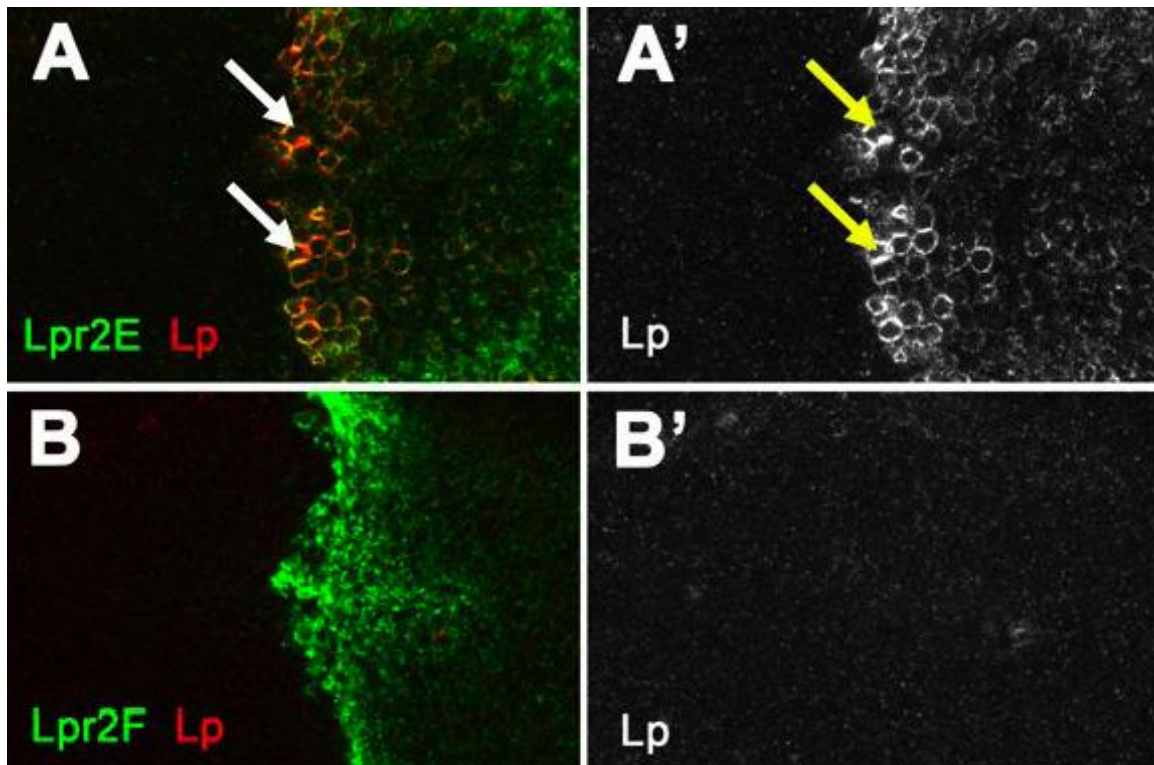


Figura 15: Imágenes de discos de ala de *Drosophila*. Donde se observa que sólo la isoforma lpr2E es capaz de estabilizar la lipoforina en la membrana(A). Mientras que la isoforma lpr2F es incapaz de producir esta estabilización (B). Receptores de lipoforinas se muestran en rojo y la lipoforina extracelular en verde. En A' y B' se muestra el canal de las lipoforinas exclusivamente.





# *Objetivos*

El objetivo principal de esta tesis es la caracterización molecular del proceso de adquisición celular de lípidos en *Drosophila melanogaster* mediado por los receptores de lipoforinas. Para ello, nos planteamos los siguientes sub-objetivos:

- Analizar genética y molecularmente la implicación de proteínas candidatas en el proceso de toma de lípidos. En concreto se analizarán lipasas y proteínas con función transportadora de ácidos grasos.
- Identificar mediante una aproximación bioquímica, proteínas que interaccionen físicamente con los receptores de lipoforinas ya sea formando parte de complejos multiproteicos o como ligandos.
- Analizar genética y molecularmente el papel de las proteínas identificadas como parte del objetivo anterior en la toma de lípidos.
- Formular un modelo molecular para la adquisición celular de lípidos en *Drosophila*.



# *Materiales y métodos*



## **Anticuerpos**

En la siguiente tabla se detallan los anticuerpos y colorantes usados para el desarrollo de esta tesis, incluyendo la concentración a la que se usaron y el organismo del cual proceden.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Especie</b>	<b>Procedencia</b>
$\alpha$ -HA	1:500	Rata	Roche
$\alpha$ -LTP	1:1000	Conejo	S.Eaton (Palm et al., 2012)
$\alpha$ -LTPII	1:1000 (WB)	Conejo	S.Eaton (Palm et al., 2012)
$\alpha$ -MYC	1:50/1:500(WB)	Ratón	Hibridoma bank
$\alpha$ -CBP	1:2000 (WB)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -aPKC C20	1:500	Conejo	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -lipoforina	1:300	Conejo	Laboratorio
$\alpha$ -DLG	1:50	Ratón	Hibridoma bank
$\alpha$ -Lpr2	1:100	Cobaya	Laboratorio

<b>Colorantes</b>	<b>Concentración</b>
Nile red	0.002%
DAPI	0,001%

## Genética

En la siguiente tabla se mencionan los transgenes y cromosomas mutantes usados para el desarrollo de esta tesis. Hemos marcado las líneas activadoras en verde y los UAS en azul.

Cepas		
<i>hh-gal4</i>	<i>mex-gal4</i>	<i>V32-gal4</i> (D. St. Johnston)
<i>tub-gal4</i>	<i>Apt-gal4</i>	<i>CY2-gal4</i> (Trudi Schüpbach)
<i>nub-gal4</i>	<i>FB-gal4</i>	<i>AB1-gal4</i>
<i>en-gal4</i> (Alfonso M. Arias)	<i>Shi<sup>ts</sup>-gal4</i>	<i>Act&lt;y&lt;Gal4, GFP-Gal4</i>
<i>P[LTP-myc]</i>	<i>UAS-lpr2F-TAP</i>	<i>UAS-lpr2E-TAP</i>
<i>w<sup>1118</sup>;Df(3R)lpr1/2</i>	<i>w<sup>1118</sup>;Df(3R)lpr1</i>	<i>w<sup>1118</sup>;Df(3R)lpr2</i>
<i>UAS-lpr2E;Df(3R)lpr1/2</i>	<i>UAS-lpr2F;Df(3R)lpr1/2</i>	OR (wt)
<i>apoLTP[excDG06206]; P[LTP-myc]</i>	<i>yw; Gla/Sm6a (BDGP)</i>	<i>In(2LR)Gla,Wg/CyO, p(h<sub>s</sub>H) (BDGP)</i>
<i>P(wHy) DG06206 (BDGP)</i>	<i>L/Cyo-Kr-GFP</i>	<i>P(wHy) DG06206/ Cyo-Kr-GPF</i>
<i>UAS-lpr2F-NCN</i>	<i>UAS-lpr2F-LA1</i>	<i>UAS-lpr2F-NCN-LA1</i>
<i>UAS-lpr2F-NCN/Df(3R)lpr1/2</i>	<i>UAS-lpr2F-LA1/Df(3R)lpr1/2</i>	<i>UAS-lpr2F-NCN-LA1/Df(3R)lpr1/2</i>

Las expresiones dirigidas de los transgenes se llevaron a cabo usando el sistema UAS/Gal4 (Brand and Perrimon, 1993). Este sistema permite activar la expresión de transgenes de manera controlada espacial y temporalmente. El sistema requiere de dos cepas transgénicas. La primera (línea activadora)



expresa la proteína de levaduras Gal4 en un patrón determinado; la segunda cepa lleva un transgén bajo el control de la secuencia reguladora de levaduras UAS (Upstream Activated Sequence), al que se une la proteína Gal4. Cruzando estas dos cepas, se obtiene una descendencia que expresa el transgén de interés en el patrón espacio-temporal que determine la línea Gal4 utilizada.

### **Fijación e inmunotinción de diferentes tejidos**

Para inmunohistoquímica, los diferentes tejidos fueron diseccionados y fijados en paraformaldehído (PP) al 4% disuelto en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de una segunda fijación en PP complementado con el detergente tritón X100 al 0.1%. Después, los tejidos fueron lavados tres veces durante un tiempo total de 1 hora en PBS suplementado con tritón X100 al 0.3% (PBT) y posteriormente bloqueados otras tres veces durante un tiempo total de 1 hora con BSA al 1% disuelta en PBT. Tras la incubación con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C, los tejidos fueron lavados tres veces durante un total de 1 hora e incubados con el anticuerpo secundario fluorescente (conjugados Alexa-fluor de invitrogen) durante 2 horas a temperatura ambiente. En el caso de los ovarios la incubación se prolongó durante toda la noche a 4°C. Después, los tejidos fueron lavados en PBT durante 1 hora (tres lavados) y montados en medio Vectashield. Se observaron en microscopio confocal.

Los lípidos neutros en discos imaginales y en ovarios fueron visualizados mediante el colorante Nile red (NR). Los tejidos ya fijados fueron incubados con NR al 0,002% diluido en PBT durante 1 hora y lavados durante 10 minutos en PBT.

Los núcleos fueron teñidos con DAPI diluido 500 veces en PBT-BSA a partir de una solución stock a 0.5µg/µl, durante 1 hora y lavados durante 10 minutos en PBT.

En algunos experimentos de inmunotinción bloqueamos la endocitosis. Para ello se utilizó el stock *shi*<sup>1</sup>; *hh-gal4*/TM6. El gen *shibire* (*shi*) codifica el homólogo en *Drosophila* de la Dinamina. El alelo *shi*<sup>1</sup> codifica una proteína termosensible que es inactiva a una temperatura de 33°C, bloqueándose por tanto la endocitosis. En los experimentos realizados, cruzamos machos de las cepas *UAS-lpr2E*, *UAS-lpr2F* y de varias quimeras por hembras *shi*<sup>1</sup>; *hh-gal4*/TM6. Larvas macho resultantes del cruce, hemizigotas para *shi*<sup>1</sup>, se incubaron a 33°C durante tres horas antes de su disección, que se realizó a 4°C. De esta manera, los distintos UAS se sobreexpresaron en el compartimento posterior del disco imaginal en condiciones de ausencia de endocitosis.

### **Disección de oenocitos en mosca adulta**

Para la disección de los oenocitos en mosca adulta cortamos con un escalpelo el abdomen de la mosca, separándolo así del resto del cuerpo. Seguidamente cortamos el extremo distal, obteniendo un abdomen aislado con una escisión en cada extremo. Se aparta el intestino y se realiza un corte a lo largo del abdomen, extendiéndolo como si fuera una lámina, se fija en PP al 4% y se continúa con el protocolo de inmunotinción previamente descrito. Una vez fijado y teñido, con la ayuda de una pinza separamos el cuerpo graso adherido a la cutícula del abdomen y junto a él se encuentran también los oenocitos. Finalmente se monta en medio Vectashield para inmunofluorescencia y se observa en un microscopio confocal.

### **Generación de transgenes**

Generación de transgenes UAS para la sobreexpresión de Fatty Acid Transport Proteins (FATPs) fusionadas al epítipo HA: Para la creación de los transgenes de FATP se obtuvieron los ADNc RE52015, correspondiente al gen

CG3394 y SD05207 correspondiente al gen *Fatp*, de Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP). Los ADNc se amplificaron por PCR usando oligonucleótidos específicos diseñados en el laboratorio a los cuales se les añadieron las enzimas de restricción Asp 718 y Hind III en los extremos (avance: **GGTACC**AAAATGAGCGAGAACGAGAAGCGTCC, retroceso: **AAGCTT** GAGTCCCGCCTTTCCCGATC para RE52015 y avance: **GGTAC** **CAA**AATGGGCTGGATTTTTGCTGTGCTCG, retroceso: **AAGCTT** GAAGCGGATTTTCGTTGCGCTGCA para SD05207; donde los nucleótidos en rojo indican los sitios de corte para las enzimas de restricción Asp718 para los oligonucleótidos de avance y HindIII para los oligonucleótidos de retroceso).

Los fragmentos amplificados se clonaron en el plásmido pGEM-t easy (Promega) a través de la adenina extra que se introduce en la reacción de PCR. A continuación, los DNAc se escindieron de pGEM-t easy mediante las enzimas de restricción Asp 718 y Hind III y se subclonaron en un plásmido derivado del plásmido pAc 5.1 (Invitrogen). Este plásmido contiene el epítipo 3xHA insertado en las dianas HindIII-XbaI. Los ADNc de los FATPs fusionados a 3xHA en su extremo C-terminal se escindieron mediante digestión con las enzimas de restricción Asp718 y Xba I y se subclonaron en el plásmido pUASattb (Bischof et al., 2007), para obtener moscas transgénicas mediante el sistema basado en la integrasa phiC31 (Bischof et al., 2007). Este método permite que la integración de los transgenes tenga lugar en la misma localización cromosómica, minimizando los efectos que puedan tener sobre la transcripción el lugar en que se produzca la inserción. La inyección del DNA y la generación de las moscas transgénicas se realizó en el servicio de microinyección de *Drosophila* del CBMSO (Madrid).

Para generar transgenes para sobreexpresar los ectodominios de las isoformas 2E y 2F como proteínas secretables partimos de los ADNc correspondientes completos clonados en el plásmido pGEM-t (Promega) (Parra-Peralbo and Culi, 2011). Amplificamos los ectodominios de los ADNc mediante PCR utilizando un par de oligonucleótidos específicos para cada secuencia, incorporando sitios de corte para Asp718 y XbaI (avance

**TCTAGATT**CGACGTAATCATTTTCTGATTC, común para ambas isoformas; retroceso AAAGATGGCCACAACCTGCG**GGTACC**, para la isoforma Lrp2E y ACCAACATGGGACCAATATGCC**GGTACC** para la isoforma Lrp2F), eliminando la región transmembrana y el dominio intracelular. Estos fragmentos se subclonaron en el plásmido pGEM-t y se secuenciaron para comprobar que no se hubieran introducido errores por el proceso del PCR. A continuación, se transfirieron al plásmido pUAS-t C-TAP mediante los sitios Asp 718 y Xba I. Este vector consiste en un plásmido pUAS-t al cual se le ha añadido una secuencia TAP (Veraksa et al., 2005). La fusión de los DNAc con la secuencia TAP mantiene la fase de lectura. Los plásmidos pUAS-t C-TAP-Lrp2E y pUAS-t C-TAP-Lrp2F se usaron para generar moscas transgénicas en el servicio de microinyección de *Drosophila* en el CBMSO. Las moscas transgénicas resultantes las llamamos *UAS-lrp2E-sol* y *UAS-lrp2F-sol*.

Para la expresión en oocitos y células nutricias de las isoformas Lrp2E y Lrp2F completas fusionadas a TAP, se generaron los transgenes *UAS-p-lrp2F-TAP* y *UAS-p-lrp2E-TAP* basados en el plásmido pUAS-p (Rorth, 1998). Este vector, a diferencia de pUAS-t o pUAS-t attb, contiene un promotor basal que permite la expresión de los transgenes en la línea germinal. En primer lugar, se amplificó la secuencia C-TAP mediante PCR y se subclonó en el plásmido pGEM-t usando la cola de adenina que añade la polimerasa en la PCR. Tras este paso y mediante las enzimas de restricción Spe I y Xba I que se agregaron en el paso de amplificación gracias a oligonucleótidos específicos, se subclonó en el plásmido pUAS-p, obteniendo el vector pUAS-p C-TAP. Los fragmentos que codifican para Lrp2E y Lrp2F completos se prepararon a partir de los DNAc GH26833 y LD11117 a los cuales mediante PCR se les añadieron secuencias de corte para Asp718 y XbaI y subclonamos las dos secuencias en pGEM-t easy. En este caso se eliminó la secuencia del codón de parada. Por último se prepararon los insertos para subclonarlos en el vector pUAS-p C-TAP usando las enzimas de restricción XbaI y Asp718. Los plásmidos resultantes se usaron para generar líneas transgénicas como en los casos anteriores.

## **Purificación por afinidad en tándem (TAP)**

TAP permite la purificación de proteínas con un alto grado de pureza a partir de un extracto complejo en condiciones nativas. Se basa en la purificación de la proteína problema mediante dos columnas de afinidad sucesivas, la primera de IgG y la segunda de calmodulina. Para ello, la proteína que se quiere purificar incorpora el *tag* TAP, el cual contiene un dominio Proteína A, de alta afinidad para las IgG, seguido de un dominio de unión a la Calmodulina y separados por un sitio de corte por la proteasa TEV (Tobacco Etch virus protease, por sus siglas en inglés).

Para el experimento con los receptores de lipoforinas secretables, sin dominio transmembrana, se usaron los transgenes de las isoformas *UAS-Irp2E-sol* y *UAS-Irp2F-sol* secretables, expresando dichas proteínas con la línea activadora *FB-Gal4*, específica del cuerpo graso. Se preparó un extracto con la hemolinfa de 100 larvas. Para ello, se rasgó la cutícula de las larvas sumergidas en buffer TAP (10mM TrisHCl pH 7.6, 150mM NaCl, 0.5mM CaCl<sub>2</sub> y 0.1% Tritón X100) a 4°C, teniendo cuidado de evitar la contaminación de la hemolinfa por restos de tejidos. Se utilizó 500 µl de buffer TAP por cada grupo de 20 larvas. Una vez obtenida la muestra se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C, para posteriormente recoger el sobrenadante. Las muestras se almacenaron a -80°C. A partir de este punto, nos basamos en el protocolo de TAP descrito por el laboratorio de Seraphin (Puig et al., 2001). El sobrenadante correspondiente a 100 larvas, en un volumen de 4500 µl, se incubó con 75 µl de bolas de agarosa recubiertas de IgG (GE Healthcare) durante 4 horas a 4°C en una noria. Las IgG reconocen a la proteína A de la secuencia TAP uniendo los receptores a las bolas de agarosa. Tras este paso se realizaron 6 lavados en buffer TAP y tras retirar el buffer se le añadió 300 µl de buffer TAP suplementado con 1 mM de DTT y 10 µl de la enzima TEV, la cual corta en la secuencia TAP, separando los receptores de las bolas de agarosa. La digestión con TEV se prolongó toda la noche a 4°C en agitación. Tras ello, se lavó la muestra durante 30 minutos en buffer CBB (buffer TAP más 10 mM de β-mercaptoetanol, 1mM

MgOAc y 1mM de imidazol). Tras los lavados la muestra se incubó 90 minutos a 4°C con 75 µl de bolas de agarosa recubiertas de calmodulina (GE Healthcare). Las bolas de agarosa se lavaron durante 30 minutos con buffer CBB. Finalmente se eluyó con buffer CBB al que se le agregó 0,1% de tritón X-100 y 20mM de EGTA, un agente quelante de calcio, que se requiere para la interacción de la calmodulina con el CBP. Se incubó con este buffer durante 10 minutos a 4°C, repitiendo este paso dos veces. Precipitamos las proteínas de las muestras con el kit "2-D clean" (GE Healthcare), siguiendo las indicaciones del comerciante. Al resultado de la precipitación se le añadió 15 µl de tampón Laemmli 2X y se hirvieron las muestras a 95°C durante 4 minutos. Tras lo cual se separaron los diferentes productos en un gel de acrilamida al 6%. Las bandas obtenidas se identificaron por espectrometría de masas (MALDI-TOF) en el parque científico de Madrid. Este proceso fue común para ambas isoformas (Lpr2E y Lpr2F).

Para el experimento realizado con receptores de lipoforinas completos, con sus dominios transmembrana, purificamos las proteínas Lpr2E-TAP y Lpr2F-TAP, junto con las proteínas que interaccionaban, de extractos de ovarios. El primer paso fue preparar los extractos. Para ello se obtuvieron 4000 ovarios de animales en los que las construcciones *UAS-lpr2E-TAP* y *UAS-lpr2F-TAP* se expresaron gracias a la línea activadora *V32-gal4*, específica de la línea germinal. Los ovarios se obtuvieron de hembras adultas jóvenes (alrededor de 5 días tras la eclosión) alimentadas con levadura. Los ovarios se diseccionaron en PBS y en hielo, en tandas de unos 250 ovarios por vez, para evitar la necrosis de los tejidos. A 250 ovarios se les añadió 500 µl de tampón de lisis compuesto por 10mM TrisHCl pH 7.6, 150mM NaCl, 0.5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% Tritón X100, 0.5mM PMSF y un coctel de inhibidores de proteasas, sin EDTA, suministrado por Roche. Se añadió Ca<sup>2+</sup> al tampón ya que se ha descrito que la interacción de varios LDLRs con sus ligandos es dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Ren et al., 2010). Los ovarios se homogeneizaron en un homogeneizador de cristal de tipo Tenbroeck y se mantuvieron en hielo 10 minutos para asegurar la lisis completa de las células, tras los cuales el lisado se centrifugó 15 minutos a 16000g, siempre a 4°C. Tras este tiempo se recogió el sobrenadante, evitando las grasas de la

superficie y se centrifugó una segunda vez a 16000g durante 5 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se almacenaron a -80°C hasta obtener los 4000 ovarios necesarios para el experimento. Este proceso fue el mismo para los ovarios lrp2F-TAP, lrp2E-TAP y OR (control silvestre).

Como en el caso anterior, el resto del procedimiento fue modificado a partir del protocolo de TAP descrito por el laboratorio de Seraphin (Puig et al., 2001). La principal diferencia es que se usaron bolas magnéticas (Dynabeads) conjugadas con IgG en lugar de una matriz de agarosa. Las dynabeads muestran una baja unión inespecífica de proteínas, por lo que es posible conseguir un alto grado de purificación con una única columna en lugar de dos purificaciones sucesivas como se hace en el TAP tradicional (una columna de afinidad de IgG seguida de una de Calmodulina). Una vez obtenidos todos los extractos, se filtraron por membranas millipore de 0,22 µm de diámetro de poro, alcanzando un volumen de 5,5 ml. Los extractos se incubaron con 200 µl de Dynabeads M-270 Epoxy (Invitrogen) conjugadas a IgG durante 2 horas a 4°C en agitación, para lo cual se usó una noria. Las IgG tienen alta afinidad por la proteína A de la secuencia TAP fusionada a los receptores de lipoforinas. Tras esta incubación se realizaron 30 minutos de lavados en tampón de lisis. La separación de las dynabeads del sobrenadante se realiza con la ayuda de un imán, puesto que las dynabeads son magnéticas. La elución se realizó incubando las dynabeads con 200 µl de tampón de lisis suplementado con 1 mM de DTT y 15 µl de enzima TEV, que tiene un sitio de corte en la secuencia TAP. La incubación con TEV fue de 3 horas a 4°C, con agitación suave en un vórtex a baja velocidad. Finalmente se recogió el eluido y se precipitaron las proteínas con el kit "2-D clean" (GE Healthcare), siguiendo las indicaciones del fabricante. El pellet se resuspendió en 15 µl de tampón Laemmli 2X y se hirvieron las muestras a 95°C durante 4 minutos. Tras lo cual se separaron los diferentes productos en un gel de acrilamida al 6%. Las bandas obtenidas se escindieron del gel y se identificaron por espectrometría de masas (MALDI-TOF) en el parque científico de Madrid.

### **Conjugación de las dynabeads con IgG de conejo.**

Para la conjugación de las Dynabeads, primero preparamos una solución de IgG. Para ello, disolvimos 25 mg de IgG de conejo en 4 ml de agua miliQ, y eliminamos los solutos no disueltos por centrifugación a 4°C durante 19 minutos a 13000 rpm. En un tubo falcon de 50 ml se añadieron 3,525 ml de la solución de IgG preparada anteriormente, 9,850 ml de buffer  $\text{NaPO}_2$  0,1M a pH 7,4 (2,62 gr de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 14,42 gr de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  y agua miliQ hasta enrasar a un 1L) y 6,650 ml de sulfato amónico 3M, el cual debe añadirse lentamente. Centrifugamos a 4500 rpm durante 20 min a 22°C.

Se resuspendieron 150 mg de Dynabeads M-270 Epoxy (Invitrogen) en 10 ml de  $\text{NaPO}_4$  0,1M a pH 7.4 en una noria durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con 4 ml del mismo tampón. Retiramos el tampón y añadimos 10 ml de la solución de IgGs descrita anteriormente en un tubo falcon, que se incubó a oscuras y en agitación en una estufa a 30°C entre 18 y 24 horas. Durante esta incubación, los grupos amina y sulfhidrilo de las IgGs forman enlaces covalentes con los grupos epoxy presentes en las Dynabeads M-270. A continuación, lavamos las Dynabeads con 6 ml de HCl glicina 100 mM a pH 2,5 y posteriormente con 6 ml de trietilamida 100mM, bloqueando los grupos epoxy libres de las Dynabeads. Finalmente, éstas se lavaron cuatro veces con PBS 1X (10 ml) durante 5 minutos, un lavado con PBS + 0,5% tritón X-100 de 5 minutos y otro de 15 minutos. Finalmente, las Dynabeads se resuspendieron en 2 ml de PBS 1X + 0,002% de azida de sodio y se conservaron a 4°C.

### **Pull-down**

Experimentos de pull-down se usaron para validar la interacción entre el LTP y las isoformas de los receptores de lipoforinas. Se indujo primero la expresión de los transgenes *UAS-lpr2F-TAP* y *UAS-lpr2E-TAP* en glándulas salivares de larvas de estadio III mediante la línea activadora *ab1-gal4*. Se



diseccionaron 40 glándulas del genotipo *UAS-lpr2E-TAP* y 4 del genotipo *UAS-lpr2F-TAP*, ya que en experimentos anteriores se observó que *UAS-lpr2F-TAP* se expresa alrededor de 10 veces más respecto a *UAS-lpr2E-TAP*. La disección se realizó en PBS suplementado con 0.5mM de  $\text{CaCl}_2$ . Se añadió  $\text{Ca}^{2+}$  al medio de disección ya que se ha descrito que la interacción de varios LDLRs con sus ligandos es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ren et al., 2010). Las glándulas salivares se homogenizaron en buffer TAP (10mM TrisHCl pH 7.6, 150mM NaCl, 0.5mM  $\text{CaCl}_2$  y 0.1% Tritón X100) y a los extractos clarificados se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de dynabeads M-270 Epoxy (Invitrogen) conjugadas con IgG de conejo. Se incubó 4 horas a 4°C en un agitador orbital. Las Dynabeads fueron lavadas varias veces con el buffer anteriormente descrito, durante 30 minutos en total a 4°C y eluidas con tampón Laemmli 2X. Las proteínas se resolvieron por SDS PAGE y el LTP se detectó por western blot con el anticuerpo  $\alpha$ -LTP. Para revelar la señal se usó un anticuerpo secundario conjugados con peroxidasa y el sistema de análisis de Western Blotting ECL Plus (Amersham Pharmacia).

### **Análisis de la concentración de LTP en la hemolinfa.**

Se comparó la concentración relativa de LTP-myc en la hemolinfa de larvas de estadio III de los siguientes genotipos: (1) *P[LTP-myc]*, (2) *apoLTP[excDG06206]; P[LTP-myc]* y (3) *Df(3R)lrp1/2* y como control OR.

Se extrajo la hemolinfa de cuatro larvas por genotipo, embebidas en 20  $\mu\text{l}$  del tampón compuesto por 10mM TrisHCl pH 7.6, 150mM NaCl, 0.5mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5mM PMSF y un cocktail de inhibidores de proteasas, sin EDTA, suministrado por Roche. La hemolinfa se extrajo a 4°C. Una vez extraída la hemolinfa se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de tampón Laemmli 2X y se hirvieron las muestras a 95°C durante 4 minutos. El extracto fue resuelto por SDS PAGE y transferido a una membrana de PDVF. La proteína LTP-myc se detectó por western blot con el anticuerpo  $\alpha$ -MYC. Para revelar la señal se usó un anticuerpo secundario conjugados con peroxidasa y el sistema de análisis de Western Blotting ECL

Plus (Amersham Pharmacia).

### **Generación de una nueva mutación en el gen *apoLTP***

Para la generación del mutante de falta de función del gen *apoLTP* nos basamos en el protocolo descrito en (Huet et al., 2002), un método basado en el elemento transponible P(wHy). Esta técnica permite generar rápidamente matrices de deleciones anidadas empezando por la inserción de una sola copia del elemento P(wHy) en cualquier ubicación del genoma. El elemento P(wHy) está compuesto por un elemento transponible HOBO flanqueado por dos marcadores genéticos (*white* y *yellow*) e insertado dentro de un elemento transponible P (figura 16). El elemento P sirve de vehículo que permite la integración en el genoma. El elemento Hobo es un elemento móvil interno, y los marcadores genéticos  $w^+$  y  $y^+$  permiten la detección de la dirección de las posibles deleciones por supresión de uno de estos marcador (figura 17). El elemento P sólo se puede movilizar en presencia de una fuente de transposasa P, y de manera similar, el elemento Hobo puede movilizarse sólo en presencia de una fuente de transposasa Hobo.

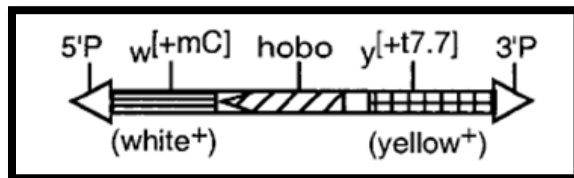


Figura 16: Esquema del elemento P(wHy)

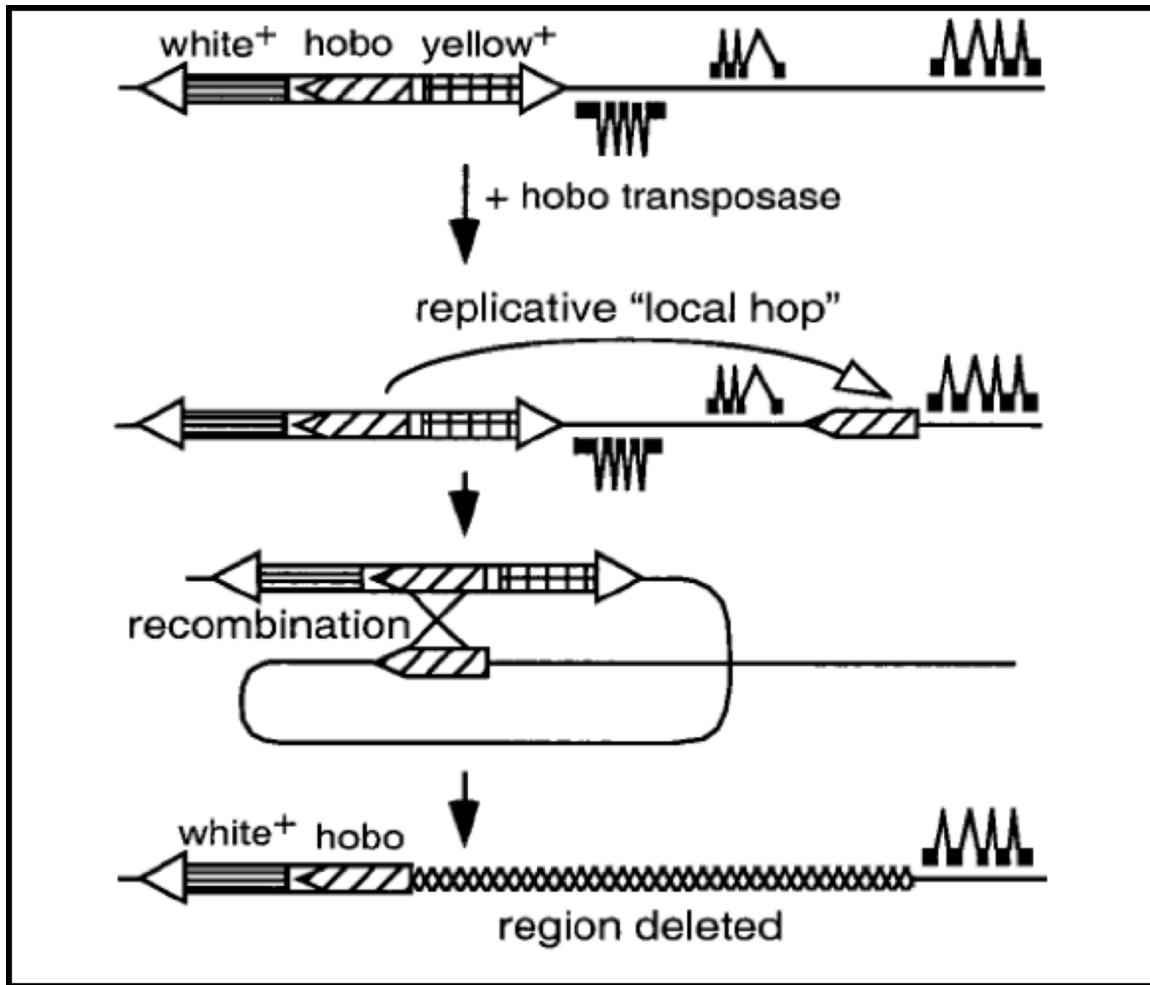


Figura 17: Esquema general de la mutación unidireccional generada por P(wHy)

El elemento móvil interno (*hobo*) tiene una alta frecuencia de movilizaciones replicativa a sitios genómicos cercanos (saltos locales) catalizada por su transposasa. Cuando se produce un salto local en la misma orientación 5' a 3' que el elemento móvil de partida, existe una alta probabilidad de recombinación entre las dos copias del elemento, conduciendo a la producción de eventos de deleción genómica y a la deleción de uno de los marcadores flanqueantes, *y*<sup>+</sup> o *w*<sup>+</sup>. Esto permite la detección de la dirección en la que se ha producido el evento de deleción (figura 18).



Figura 18: Ejemplo de delección de la región yellow del elemento P(wHy)

Para crear una delección en el gen *apoLTP*, se obtuvo el stock P(wHy) DG06206 de la colección Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) insertado en este gen y se cruzó con un stock que contenía un transgén que permite la expresión de la transposasa de Hobo controlada por un promotor de heat shock (In(2LR)Gla,Wg/CyO, p(hsH)). Las larvas resultantes que eclosionaron, se sometieron a un total de 3 choques térmicos a 37°C durante 30 minutos, espaciados por dos días, a fin de inducir la expresión de la transposasa y la posible movilización del elemento HOBO. Cruzamos grupos de 2 machos de genotipo *P(wHy) DG06206/CyO, p(hsH)*, en los que potencialmente pudo haberse producido la escisión del elemento HOBO en la línea germinal, por hembras *y w; Gla/SM6a*. De la descendencia, seleccionamos machos *y w; P(wHy) DG06206/Sm6a* que hubieran perdido el rescate *y*, es decir, con los cuerpos amarillos. Ello indica que en estos machos se ha producido una delección que afecta al menos al gen *y<sup>+</sup>* adyacente. Estos machos los cruzamos individualmente por hembras *y w; Gla/SM6a* a fin de establecer cepas balanceadas estables. Obtuvimos 16 machos que perdieron el gen *y<sup>+</sup>*. Una única de estas cepas mostró letalidad en homocigosis, por lo que era una buena candidata a contener una mutación en el gen *apoLTP*. A fin de examinar la región delecionada mapeamos los extremos de la delección mediante secuenciación a través de PCR inversa (iPCR). Para ello extrajimos ADN genómico de esta cepa y de la cepa paterna *P(wHy)DG06206*. Digerimos el DNA con la enzima de restricción Alu I, la cual genera fragmentos de pequeño tamaño debido a que reconoce una secuencia de sólo 4 nucleótidos. Posteriormente procedimos a la ligación de los fragmentos obtenidos por el corte

de Alu I, en un volumen alto para favorecer la recircularización y no las ligaciones entre moléculas (10 unidades de Alu I en un volumen total de 23,5 µl, donde 10 µl pertenecen al ADN genómico, 2,5 µl al buffer de la Alu I, 2 µl a la ARNasa a una concentración de 100 µg/ml y 9 µl al agua destilada). A continuación, amplificamos los fragmentos que contienen el elemento transponible P mediante una PCR inversa. El protocolo se basa en el descrito por J. Rehm de BDGP (Berkeley *Drosophila* Genome Project) disponible en [www.fruitfly.org/about\\_methods\\_inverse.pcr.html](http://www.fruitfly.org/about_methods_inverse.pcr.html). En nuestro caso usamos los oligonucleótidos "3-1" y "3-2" (ver tabla 2 de Oligonucleótidos (P(wHy)DG06206) diseñados de forma que amplificaran a partir del extremo del elemento Hobo (ver figura 36). Obtuvimos un fragmento de 310 pares de bases que se secuenció en el servicio de secuenciación del campus de Cantoblanco, parque científico de Madrid. Esta secuencia nos indicó la región delecionada.

Oligonucleótido	Secuencia
Oligo de elementos P	CGACGGGACCACCTTATGTT
3-1	AGGAGGCTATCTACAGATTTTGG
3-2	GATCGTTGACTGTGCGTCCACTCA
3-3	GAGTACCGAGTGTTTATCGGGTGG
Secuencia colindante HOBO 3´	CACACGTATGCGATGTTAAATAGTG
W2comp	ACAGTATGAAATCGAAATCGCATC
xp to genomic ful	CAGCCTTCCACTGCGAATCA
Hobodelcomp	CTCAGTGCATGCCTCTAATACT
Hobo del 1	TGCAGCACTTGCAGGTGAC
Hobo del 2	TGCAAAGAAGGGAAACAAAGAGG
Xp to deletion	CGCACTTATTGCAAGCATACG

Tabla 2: Oligonucleótidos P(wHy) DG06206

Para comprobar que efectivamente la cepa obtenida contenía la deficiencia que sugerían nuestros datos de secuenciación, realizamos una serie de tres PCRs utilizando ADN genómico del stock original y del stock

delecionado. Con el primer PCR se comprobó que la región genómica adyacente al marcador white (extremo 5' del elemento P(wHy)), estaba intacta en ambos stocks (Oligonucleótidos 1+2). Un segundo PCR amplificaba la región comprendida desde el extremo 3' del elemento HOBO hasta el sitio del genoma presuntamente deletado (Oligonucleótidos 3+4). Este PCR únicamente debe ser positivo en el stock deletado y no en el original (P(wHy) DG06206). Y por último, con un tercer PCR examinamos la presencia de la región genómica adyacente al extremo 3' de la inserción P(wHy) DG06206 y que está presuntamente deletada en la escisión (figura 19).

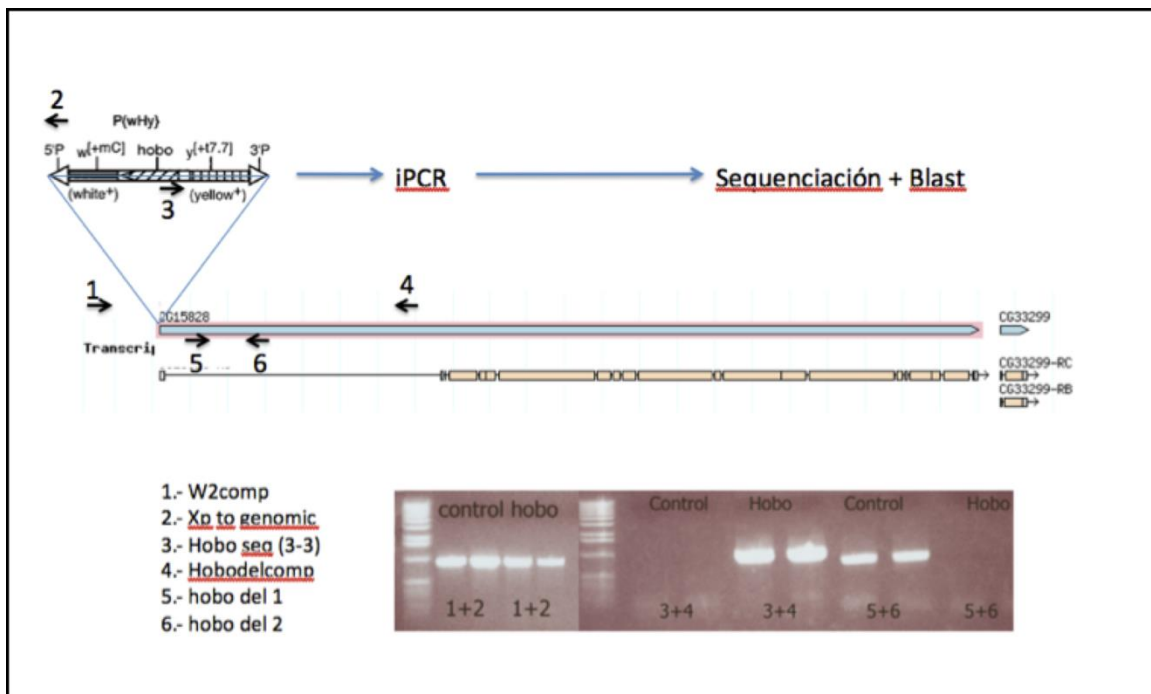


Figura 19: Esquema del gen LTP y localización de los oligonucleótidos utilizados para la comprobación de la zona deletada. En el gel de agarosa se observan los productos de tres PCR distintas utilizando los oligonucleótidos y los ADN genómicos señalados. "Hobo" se refiere al ADN genómico procedente del stock que contiene la deleta y "control" se refiere al stock original P(wHy)DG06206. Cada PCR se realizó por duplicado a partir del ADN de dos individuos homocigotos.

Con el fin de obtener ADN genómico de larvas homocigotas para la escisión de P(wHy) DG06206, primero balanceamos la mutación con un "balanceador verde", es decir, que expresa GFP (CyO, Kr-Gal4, UAS-GPF). Los individuos homocigotos pueden seleccionarse por la ausencia de señal GFP bajo un microscopio de fluorescencia.

### **Generación de clones de sobreexpresión en ovarios**

Para generar clones en las células foliculares se cruzaron las líneas *hs-flp;UAS-Irp2E;Df(3R)Irp1\_2/TM6* y *hs-flp;Irp2F;Df(3R)Irp1\_2/TM6* por el stock *act<y<Gal4, UAS-GFP;Df(3R)Irp1\_2/TM6*. Este cromosoma se caracteriza por tener un promotor de actina que dirige la expresión de Gal4, separados por un casete *y+* flanqueado por secuencias FRT. El casete *y+* se puede eliminar mediante la recombinación de las secuencias FRT inducida por la expresión de un *hs-flipasa* después de un choque térmico. La eliminación del casete pone en contacto el promotor de actina con la secuencia *gal4*, induciéndose su expresión (Ito et al., 1997). A las hembras resultantes se les dio un choque térmico de 36°C durante 4 minutos, tres días antes de la disección de los ovarios. Se diseccionaron los ovarios de hembras que habían sido alimentadas con levadura durante cinco días.





# ***RESULTADOS***



## **1. Búsqueda de proteínas involucradas en la toma de lípidos en *Drosophila*.**

### **1.1. Análisis de transportadores de ácidos grasos y lipasas.**

Estudios previos de nuestro y otros laboratorios mostraron que el transporte y adquisición de lípidos por los tejidos en *Drosophila* tiene ciertos paralelismos con la toma de lípidos neutros en los tejidos periféricos de mamíferos. Sin embargo, muchos aspectos de estos mecanismos de toma de lípidos todavía se desconocen en insectos. Como se ha explicado en la introducción, en mamíferos los lípidos neutros provenientes de la dieta pasan al torrente sanguíneo en forma de TAG contenido en quilomicrones. En los microcapilares periféricos se produce la hidrólisis de este TAG por parte de la Lipasa de lipoproteínas, transformándose un producto insoluble, los TAG, en un compuesto soluble, como son los ácidos grasos. Éstos son transportados desde el lumen de los capilares hacia los tejidos subyacentes (músculo y tejido adiposo principalmente) gracias a transportadores de ácidos grasos como las FATPs (por sus siglas en inglés, Fatty Acid Transport Protein) y el *scavenger receptor* CD36, expresados en las células endoteliales (Dallinger-Thie et al., 2010; Glatz et al., 2010) (figura 7). Esta ruta podría estar conservada en *Drosophila*, por lo que decidimos examinar si en este organismo existen transportadores de ácidos grasos y lipasas con funciones similares.

Observamos que existen 3 genes con alta homología a las proteínas FATP, 14 genes con posible función *scavenger receptor* y 56 genes con posible función lipasa (Horne et al., 2009). En primer lugar, examinamos 22 lipasas que fueron preseleccionadas según dos criterios: la presencia de un péptido señal indicativo de actividad extracelular y por su patrón de expresión, es decir, se seleccionaron aquellas lipasas que se expresasen en los tejidos donde se produce toma de lípidos (discos imaginales, ovarios y músculos) o bien en el cuerpo graso, desde donde estas lipasas podrían secretarse a la hemolinfa.

Descartamos aquellas lipasas que se expresaban principalmente en el intestino, indicando una función digestiva. Seleccionamos también 6 genes *scavenger receptor* basándonos para su selección en sus patrones de expresión, con los mismos criterios de antes, y 3 transportadores de ácidos grasos.

A continuación, analizamos las posibles funciones de los genes candidatos en *Drosophila* mediante su silenciamiento por ARN interferentes (ARNi) expresándolos mediante el sistema UAS/Gal4 en diferentes tejidos. Elegimos dos líneas activadoras específicas del disco de ala, *hh-gal4* que se expresa en el compartimento posterior y *nub-gal4*, que se expresa en la zona distal de disco imaginal de ala. De este modo, si las proteínas candidatas participan en la ruta de toma de lípidos, su silenciamiento debería resultar en un fenotipo de ausencia o disminución de las inclusiones lipídicas celulares en los compartimentos del disco de ala afectados. Es importante destacar que en estos experimentos y en el caso de las lipasas, suponemos que su síntesis sucede de forma local y que por tanto, su silenciamiento tendrá un efecto también local como ocurre en mamíferos. Sin embargo, si las lipasas son secretadas a la hemolinfa estos experimentos no darían un resultado positivo aunque la lipasa estuviera involucrada en el proceso. Por ello, a parte de las líneas activadoras específicas del disco de ala, utilizamos también una línea activadora generalizada, *tub-gal4*. De esta manera podemos disminuir la cantidad de la proteína candidata en toda la larva y por tanto detectar efectos no autónomos sobre la toma de lípidos. En todos los casos, se examinó la distribución de las inclusiones lipídicas en las células de los discos imaginales mediante el colorante lipofílico Nile red.

Ninguno de los genes analizados con las 3 líneas activadoras usadas dio un resultado positivo, sugiriendo que no intervienen en la ruta de toma de lípidos (tabla 3 y figura 20). Alternativamente, es posible que no detectáramos un fenotipo debido a que exista redundancia funcional con otros genes. Por ello, en el caso de los genes FATP decidimos tomar una aproximación alternativa mediante su sobreexpresión en el disco de ala, lo que podría producir fenotipos dominantes. Al no existir cepas de *Drosophila* que permitan la sobreexpresión de

los genes FATP, construimos en el laboratorio los transgenes *UAS-CG7400* y *UAS-CG3394*, ambos fusionados a una secuencia HA C-terminal. *CG3394* se expresa en ovarios e intestino y *CG7400* se expresa en cuerpo graso e intestino. Para su sobreexpresión utilizamos la línea activadora *en-gal4* y examinamos un posible aumento de acumulación de lípidos en la región posterior del disco imaginal de ala. La sobreexpresión de estos dos FATP no alteró la cantidad de inclusiones lipídicas celulares (figura 21).

Lipasas	<i>Scavenger receptors</i>	FATPs
CG18301	CG3829	CG7400
CG1986	CG12789	CG3394
CG31872	CG31741	CG30194
CG4582	CG62736	
CG5966	CG61887	
CG6113 (31021)	CG7227	
CG6113 (31022)		
CG6271		
CG6283		
CG6295		
CG6296		
CG6472		
CG6847		
CG6277		
CG4979		
CG11029		
CG33174		
CG7365		
CG4267		
CG13282		
CG10163		
CG5162		

Tabla 3: Genes de lipasas, *scavenger receptors* y FATPs analizados mediante su silenciamiento por ARNi y las líneas activadoras *nub-gal4*, *tub-gal4* y *hh-gal4*

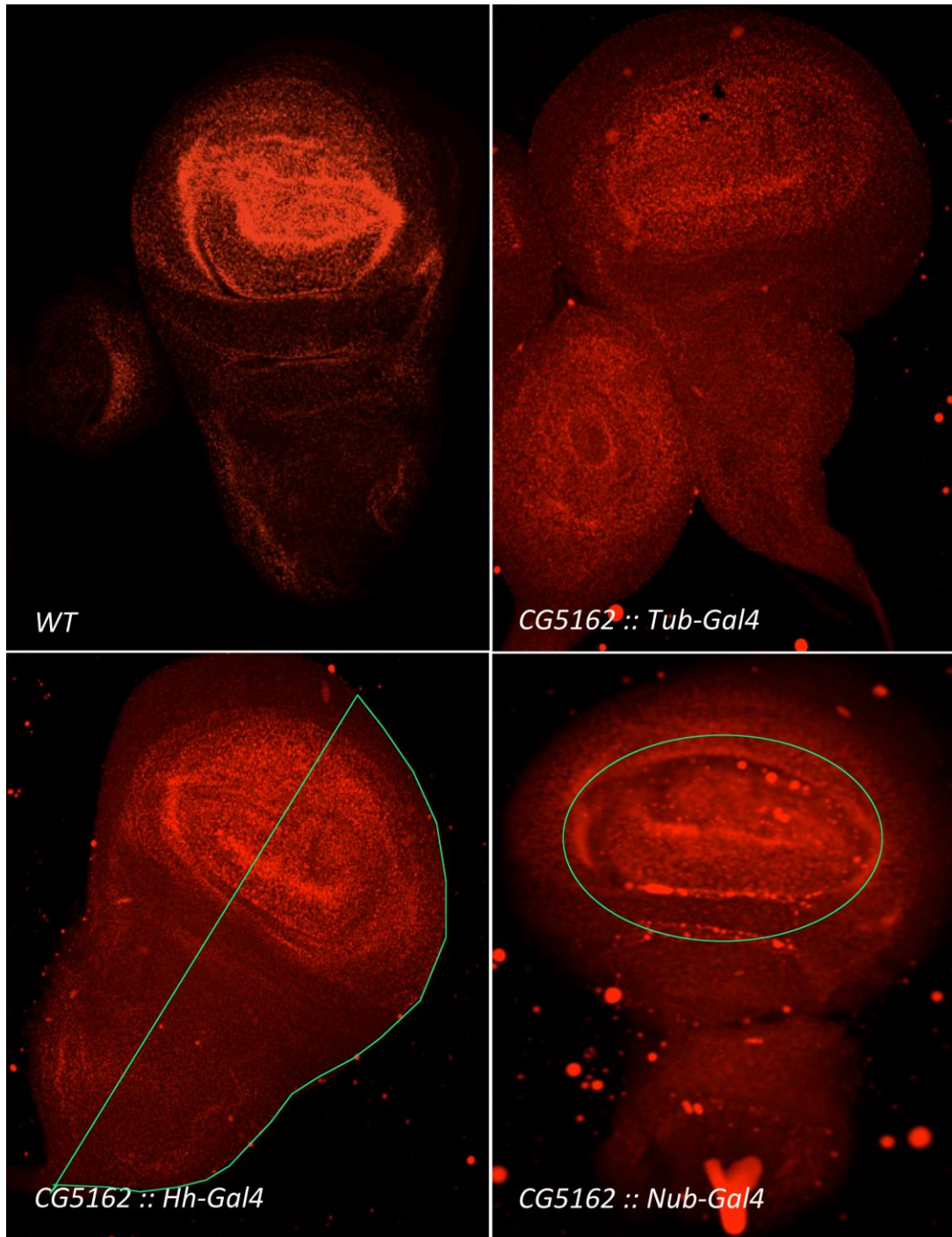


Figura 20: Sobreexpresión de UAS-ARNi correspondiente a la lipasa CG5162 mediante tres líneas activadoras según se indica. Los lípidos neutros están teñidos con Nile red (en rojo). No se observó ningún cambio en la cantidad de lípidos con ninguna de las líneas activadoras empleadas. *tub-gal4* dirige expresión generalizada, mientras que en la línea activadora *hh-gal4* la expresión está dirigida a la parte posterior del disco imaginal de ala y la línea activadora *nub-gal4* la expresión es distal, según se indica mediante la línea verde. En esta imagen se seleccionó la lipasa CG5162 como ejemplo, obteniéndose resultados parecidos con los otros genes candidatos. Todas las imágenes corresponden a discos imaginales de ala

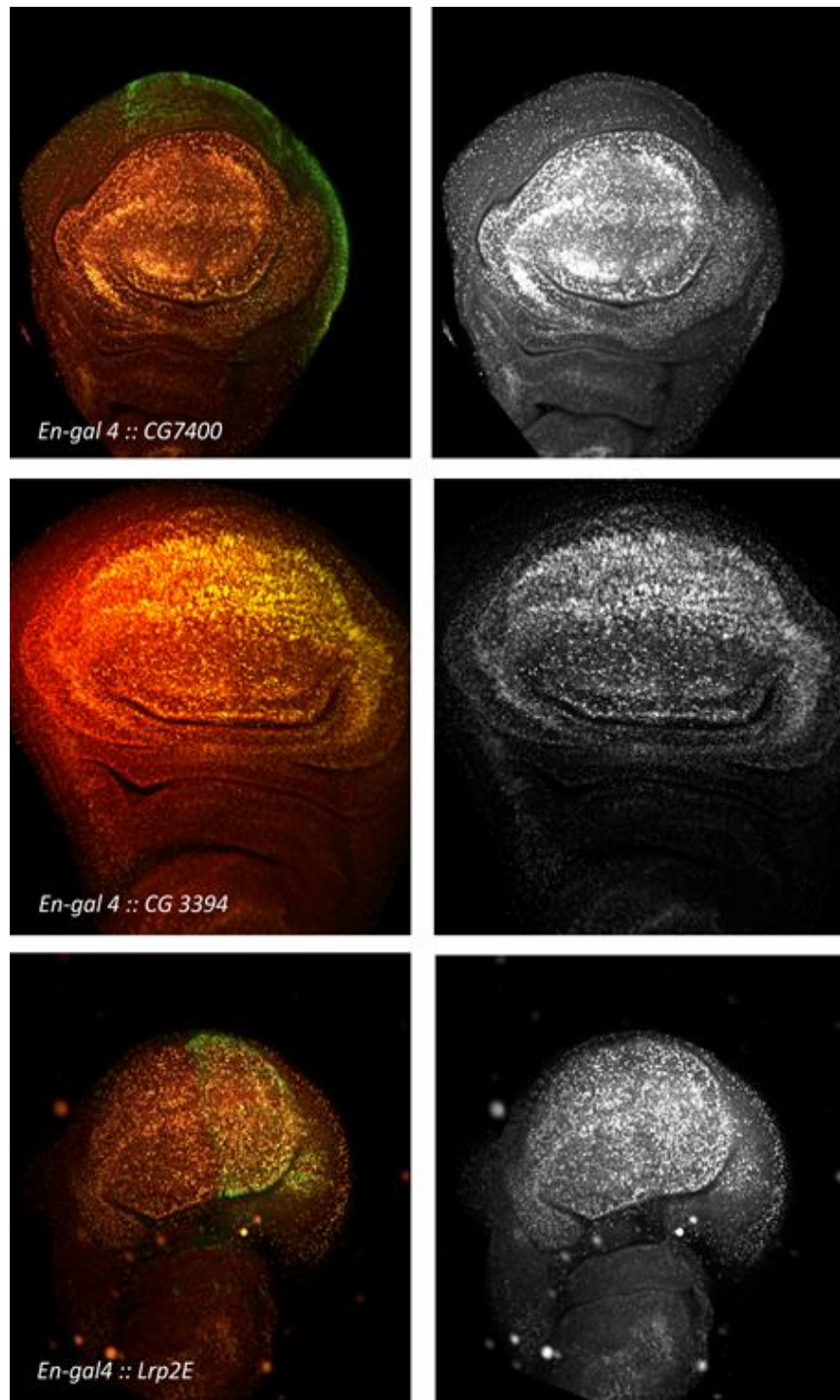


Figura 21: Sobreexpresión de los genes FATP CG7400 y CG3394 y de la isoforma Lrp2E dirigidos por la línea activadora *en-gal4*, según está indicado en la figura. La isoforma Lrp2E y los FATPs se muestran en verde y los lípidos neutros en amarillo mediante el colorante Nile red. La línea activadora *en-gal4* dirige la expresión a la parte posterior del disco imaginal de ala.



El sistema UAS/Gal4 induce altos niveles de expresión por lo que si varias proteínas se requieren en la misma ruta, una de ellas puede resultar limitante. Esto podría haber enmascarado nuestros resultados. Para ver si este era el caso, decidimos expresar conjuntamente los receptores de lipoforinas con los genes FATP CG7400 y CG3394 y examinar un posible efecto sinérgico. Para ello usamos la línea activadora *en-gal4* que se expresa en el compartimento posterior del disco imaginal del ala, utilizando el compartimento anterior como control. Revelamos los lípidos neutros mediante el colorante Nile red. Tampoco en estas condiciones de coexpresión vimos un aumento en la acumulación de inclusiones lipídicas para ninguna de las dos FATP examinadas (figura 22).

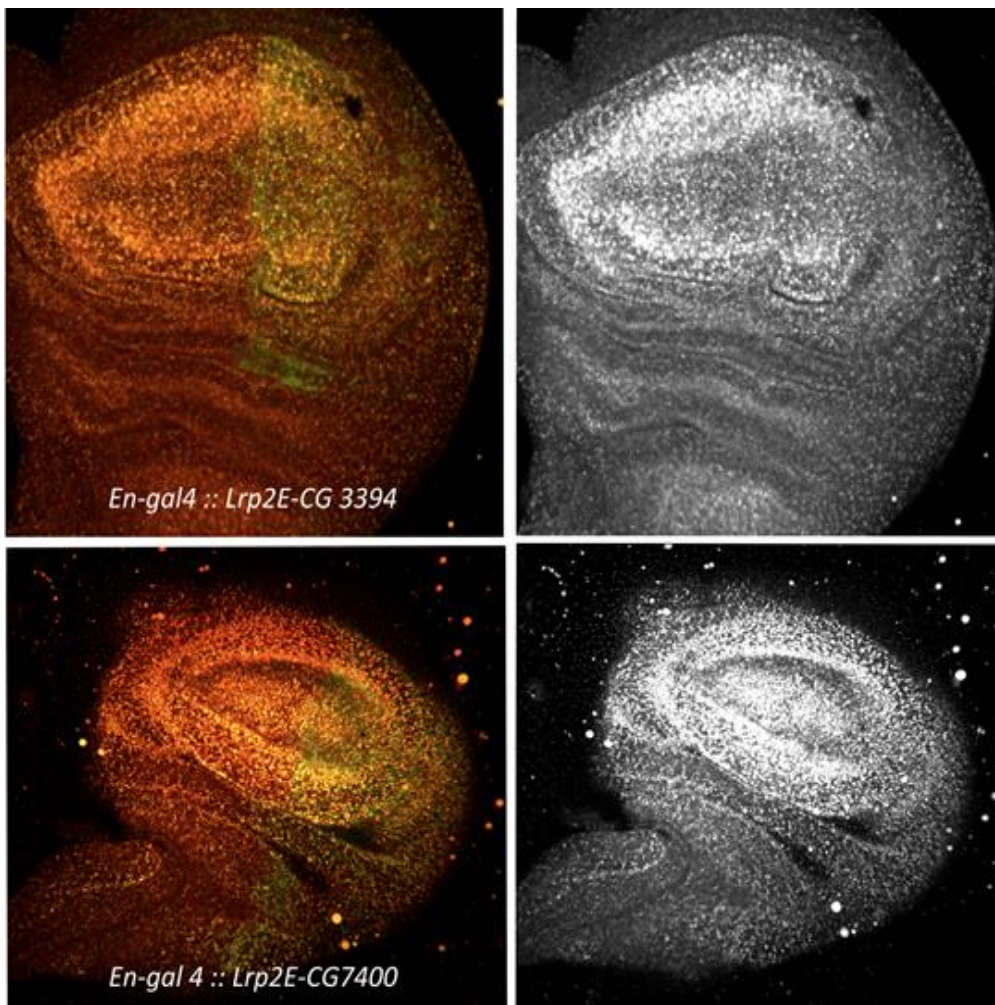


Figura 22:  
Sobreexpresión de Lrp2E junto con los FATPs CG3394 o CG7400. Donde los receptores de lipoforina y las FATPs están marcados en verde y los lípidos neutros en amarillo. La línea activadora *en-gal4* dirige la expresión a la parte posterior del disco imaginal de ala.



En su conjunto, nuestros datos sugieren que las lipasas y las FATP analizadas no participan en el proceso de toma de lípidos neutros.

## **1.2. Búsqueda de proteínas que interaccionan físicamente con los receptores de lipoforinas.**

Siguiendo con el objetivo de caracterizar los mecanismos moleculares que median la toma de lípidos neutros en *Drosophila*, y considerando que nuestra aproximación anterior basada en el análisis de candidatos no resultó fructífera, decidimos emprender una aproximación bioquímica dirigida a identificar y caracterizar el mayor número posible de proteínas involucradas en el proceso de toma de lípidos. Para ello, quisimos identificar proteínas y ligandos que interaccionen físicamente con los receptores de lipoforinas, elementos centrales en el proceso de toma de lípidos. Para ello utilizamos la potente técnica de Tandem Affinity Purification (TAP), basándonos en el protocolo del laboratorio de Seraphin (Puig et al., 2001) con algunas modificaciones (ver materiales y métodos). El primer lugar fusionamos la secuencia TAP a los receptores de lipoforinas para facilitar de este modo su purificación por afinidad. El fragmento TAP contiene un dominio Proteína A seguido de un dominio de unión a la Calmodulina y separados por un sitio de corte por la proteasa TEV (figura 23). Ello permite la purificación de la proteína fusionada a la secuencia TAP junto con las que interaccionen con ella mediante dos columnas de afinidad sucesivas (matriz unida a IgG y a Calmodulina, respectivamente) en condiciones nativas y con un alto grado de pureza. Una vez purificados los complejos, las proteínas componentes se separan por PAGE y las bandas obtenidas se identifican por espectrometría de masas (MALDI-TOF).

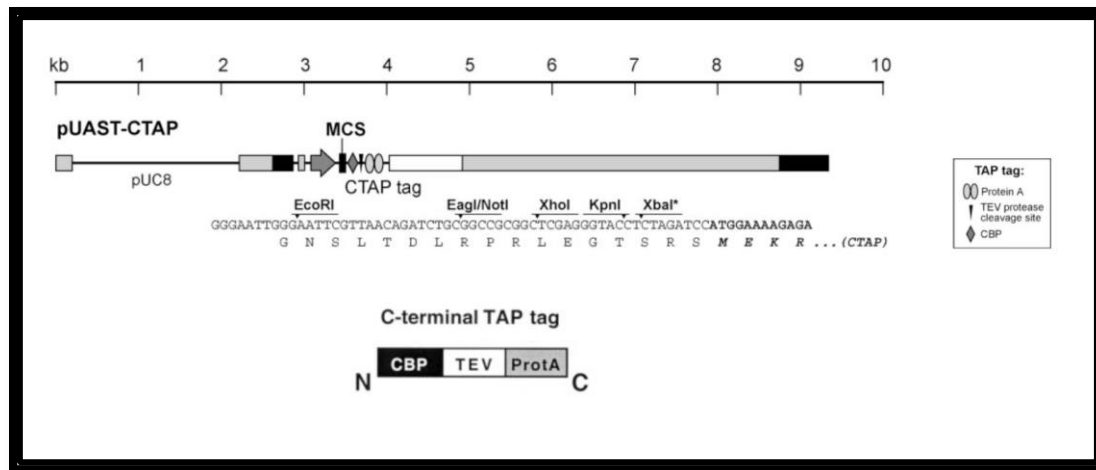


Figura 23: Estructura del plásmido pUAST-CTAP y composición del tag TAP

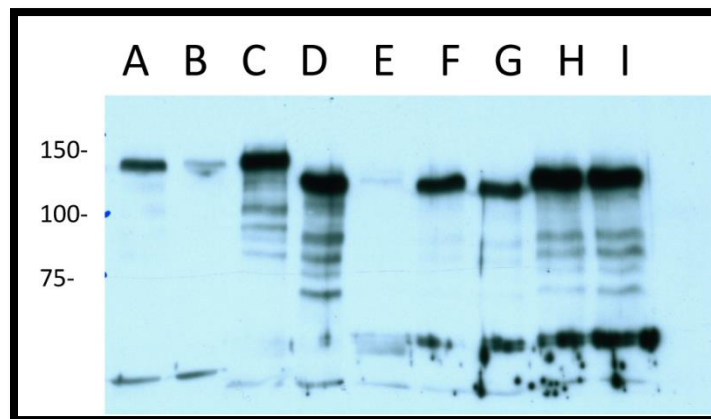


Figura 24: Progresión de la purificación de Lpr2E\_ectodominio unido a la secuencia TAP. Western blot que muestra la concentración de Lpr2E\_ectodominio en las distintas fracciones de la purificación. La columna A corresponde al lisado total y la B al lisado tras la incubación con las bolas de agarosa recubiertas de IgG. La columna C se corresponde a la cantidad de proteína unida a las bolas de agarosa recubiertas de IgG antes de la acción de la proteasa TEV y la columna D se observa la cantidad de proteína tras la acción de la proteasa

TEV, donde se ve la diferencia de tamaño con respecto al paso previo debido a la escisión del dominio proteína A de la secuencia TAP. En la columna E se muestra la cantidad de proteína que quedó unida en las bolas de agarosa recubiertas de IgG y en la F, la cantidad de proteína que no se ha unido a las bolas de agarosa recubiertas de calmodulina, para mostrar en la columna G la cantidad de proteína que si se ha unido a dichas bolas. Las columnas H e I se corresponden con las eluciones consecutivas de la proteína. Las columnas A, B y C están a una concentración de 1X, las columnas D, E, F y G están a una concentración de 2X y las columnas H e I están a una concentración de 4X.

Fusionamos la secuencia TAP al extremo C-terminal de la isoforma Lpr2E, que media la toma de lípidos y al de la isoforma Lpr2F, inactiva respecto a la toma de lípidos. Al tratarse de dos isoformas que comparten gran parte de su secuencia aminoacídica pero funcionalmente muy distintas, Lpr2F resultaba un control negativo muy valioso para nuestro estudio. Se realizaron dos tipos de transgenes. En un caso se eliminaron los dominios transmembrana e intracelular de los receptores, convirtiéndolos en secretables. Para el segundo tipo de transgenes, se fusionaron los receptores completos a la secuencia TAP y por tanto permanecían unidos a la membrana. En la figura 24 se ilustra un experimento típico de purificación, usado para poner a punto la técnica, en el que se muestra la concentración de la forma secretable Lpr2E\_ectodominio-TAP a lo largo de las distintas fracciones de purificación.

#### 1. Resultados obtenidos con los receptores de lipoproteínas secretables:

En un primer tipo de experimentos, utilizamos receptores de lipoproteínas fusionados a TAP secretables. Realizamos esta aproximación ya que pensamos que sería más factible purificar los receptores como moléculas solubles de la hemolinfa que no como proteínas transmembrana. Purificar proteínas transmembrana tiene dificultades adicionales, ya que deben solubilizarse de la membrana con el uso de detergentes que a su vez pueden desnaturalizar a las proteínas y disociar complejos multiproteicos. Los transgenes se construyeron en el plásmido pUAST y la línea activadora usada fue *FB-gal4*, el cual dirige la expresión en el cuerpo graso. El extracto se produjo mediante la disección de larvas en estadio III. Después de inmunoprecipitar los receptores de lipoforinas, se separaron los complejos proteicos mediante PAGE y se identificaron estos complejos mediante espectrometría de masas. Son especialmente interesantes para nuestro estudio las proteínas que aparecen asociadas a la isoforma Lpr2E y no a la isoforma Lpr2F, ya que únicamente la isoforma Lpr2E media la toma de

lípidos. Obtuvimos 6 bandas para la isoforma Lpr2E y 2 bandas para la isoforma Lpr2F, no habiendo ninguna en común entre los dos receptores. De las 6 bandas aisladas con Lpr2E, dos correspondía al propio receptor y a productos de degradación (figura 25 y tabla 4).

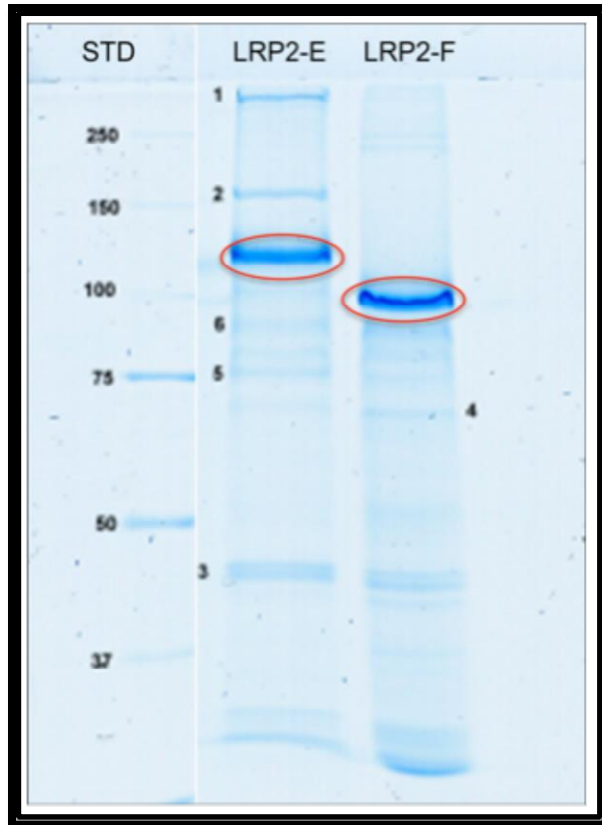


Figura 25 Resultado del TAP realizado a las formas solubles de los receptores de lipoforinas, Proteínas eluidas junto a los receptores Lpr2E-TAP y Lpr2F-TAP solubles. Las bandas numeradas se identificaron por espectrometría de masas. El círculo rojo indica los receptores de membrana.

Tabla 4: Proteínas identificadas por espectrometría de masas resultado del TAP realizado a las formas solubles de los receptores de lipoforinas.

	Proteína identificada	Breve descripción
1	CG15828	Proteína relacionada con el metabolismo lipídico
2	Peroxidasina	Componente de la matriz extracelular
3	RAP	Chaperona
4	Calmodulina	Regulador transducción señal de calcio
5	TepII	Proteína relacionada con la inmunidad
6	Lpr2	Degradación del Propio receptor

Todos los pesos moleculares se corresponden con lo esperado a excepción de la banda número 6 que se identifica como Lpr2, pero no se corresponde con su peso molecular, esto puede ser debido a que sea producto de la degradación de dicho receptor.

La Peroxidasina es una proteína presente en la matriz extracelular (Nelson et al., 1994). Si bien interacciona específicamente con Lpr2E, al no estar relacionadas con la toma de lípidos no se considerará en esta tesis.

Es interesante remarcar la presencia de Receptor Associated Protein (RAP) entre las proteínas interaccionantes. RAP es una chaperona que se ha visto que interviene en el correcto plegamiento de todas las proteínas de la familia LDLR en mamíferos. Esta proteína se asocia con los LDLR en el retículo endoplasmático acompañándolos a lo largo de la vía secretora y evitando que se replieguen sobre si mismos (Willnow, 1998). Por tanto, se trata de un positivo esperado y valida la técnica que hemos usado.

La identificación de la calmodulina se debe muy probablemente a un artefacto de la técnica. La secuencia TAP con la que se han marcado los receptores de lipoforinas contiene un dominio de unión a calmodulina (el *Calmodulin binding peptide*, CBP) para posibilitar su purificación por afinidad. Sin embargo, este dominio también se puede unir a la Calmodulina endógena de la mosca.

La Thioester protein II (TepII) es una molécula relacionada con inmunidad. Media la fagocitosis de bacterias y cuerpos extraños mediante su unión a estos, señalándolos como elementos ajenos y facilitando el reconocimiento de los macrófagos (Levashina et al., 2001). Al no estar relacionada con metabolismo lipídico, no se examinará en esta tesis.

El CG15828 es de todas las proteínas identificadas la más interesante, ya que tiene homología con la Apolipoproteína y con la ApoB de mamíferos, relacionándola por tanto con el metabolismo lipídico. Además, no interacciona con la isoforma control lpr2F.

## 2. Resultados obtenidos con los receptores de lipoproteínas transmembrana:

Con el objetivo de identificar proteínas adicionales que interaccionen con Lpr2E, decidimos realizar un nuevo experimento de purificación a gran escala pero usando formas completas de los receptores, es decir, los receptores transmembrana. Ello nos permitirá aislar interacciones que sólo puedan ocurrir en la superficie celular y no en la hemolinfa, como por ejemplo la interacción con otros receptores transmembrana. Para ello, al igual que anteriormente fusionamos la secuencia TAP al extremo C-terminal de Lpr2E y Lpr2F. Para esta aproximación decidimos aislar los complejos de extractos de ovarios, ya que este tejido tiene una fuerte actividad de adquisición de lípidos. Por ello, resultó necesario generar los transgenes en el plásmido pUAS(P) ya que éste, a diferencia de pUAS<sub>T</sub>, tiene un promotor basal que permite su expresión en la línea germinal. Los ovarios de hembras que expresan *UAS(P)lpr2E-TAP* o *UAS(P)lpr2F-TAP* en la línea germinal mediante la línea activadora *V32-gal4* se diseccionaron, homogeneizaron y se procesaron según se describe en materiales y métodos. Tras el proceso de purificación de los receptores, analizamos los eluidos correspondientes. Las distintas proteínas identificadas se ilustran en la figura 26 y en la tabla 5. Obtuvimos 6 bandas para el caso de la isoforma Lpr2E, dos de estas bandas se corresponden con el receptor y a productos de degradación de este. Es especialmente interesante la identificación, como en el experimento realizado con los receptores de lipoforinas secretables, de la proteína CG15828 como un interaccionante de Lpr2E, apoyando por tanto el que se trate de un positivo real. También identificamos la Apolipoforina, un ligando esperado de los receptores de lipoforinas (Dantuma et al., 1999).

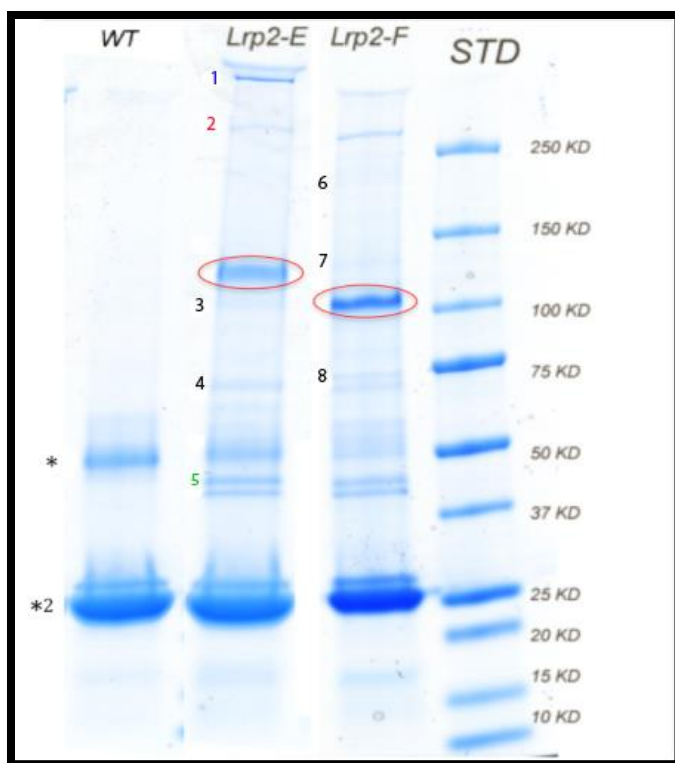


Figura 26: Resultado del experimento de purificación por afinidad realizado con las formas transmembrana de los receptores de lipoforinas. Se indican con un número las bandas que se identificaron por espectrometría de masas. Las bandas rodeadas de rojo corresponden a los receptores de lipoforinas usados como cebos en el experimento. La banda 1, en azul, corresponde a la proteína CG15828. La banda 2, en rojo, se identificó como Apolipoforina y la banda 5, en verde, como la proteína RAP. Los asteriscos indican la subunidad grande y pequeña de las IgGs.

Tabla 5: Proteínas identificadas por espectrometría de masas resultado del TAP realizado a las formas completas de los receptores de lipoforinas.

Banda	Proteína identificada	Breve descripción
1	CG15828	Proteína relacionada con el metabolismo lipídico
2	Apolipoforina	Proteína relacionada con el metabolismo lipídico
3	Lpr2	Degradación del propio receptor
4	HSC70-4	Chaperona
5	Rap	Chaperona
6	Yolkless	Receptor de vitelogenina
7	Myosin kinasa 2 (Ratón)	Proteína kinasa (contaminación)
8	Proteína de suero de larva 2 (Lsp2)	Proteína de almacenamiento

Otra proteína identificada fue la chaperona Heat shock protein cognate 4 (HSC70-4), una chaperona de expresión ubicua en el organismo. Se trata probablemente de un artefacto, ya que es una proteína muy abundante y se ha descrito como artefactual en otros ensayos parecidos (Gingras et al., 2007).

Al igual que en el experimento con la versión secretable de Lpr2E, volvimos a identificar a la chaperona RAP, importante en el plegamiento de las proteínas de la familia LDLR.

Con la isoforma Lpr2F se obtuvieron 4 bandas, siendo una de ellas el propio receptor. Observamos una banda de peso molecular de alrededor de 110 kDa que probablemente corresponde a la lipoforina, ya que migra en una posición similar a la banda identificada como lipoforina en el experimento con Lpr2E (figura 26), si bien no procedimos a su identificación por espectrometría de masas. Otra banda corresponde a Yolkless, una proteína que pertenece a la familia de los receptores de lipoforinas. La consideramos un artefacto, ya que es muy abundante en ovarios. Lo mismo sucede con la Larval serum protein 2 (Lsp2), una proteína muy abundante en la larva de *Drosophila*, cuya interacción consideramos no específica.

## **2. Caracterización del gen CG15828**

Como hemos mencionado previamente, resultó especialmente interesante la obtención de la proteína CG15828 como interaccionante con la isoforma Lpr2E, que media la toma de lípidos, pero ausente en la isoforma Lpr2F, incapaz de mediar la toma de lípidos. Mediante una búsqueda en las bases de datos de secuencias de proteínas usando el software BLAST, vimos que CG15828 tiene homología con la Apolipoforina de insectos, la ApoB humana y la Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP) (figura 27). Ello indica que CG15828 pertenece a la familia de las Large Lipid Transfer Proteins (LLTP) que se caracterizan por tener un dominio vitelogenina (también conocido como LLT)



(Smolenaars et al., 2007).

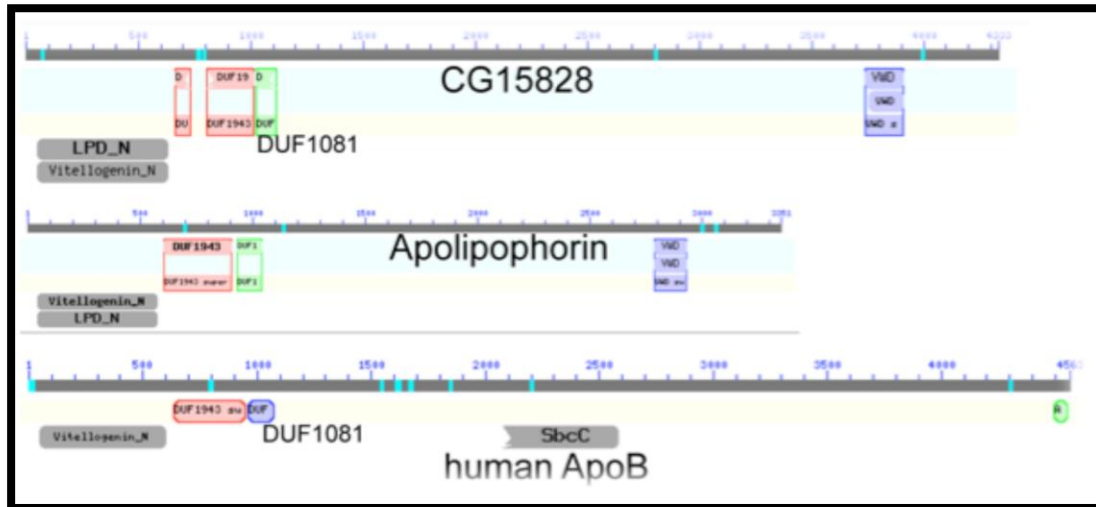


Figura 27: Comparativa estructural entre el CG15828 de *Drosophila*, la apolipoforina de insectos y ApoB de humanos, donde se observa que todos ellos tienen un dominio vitelogenina N-terminal.

A la vez que estábamos realizando este trabajo, el grupo de Suzanne Eaton describió la identificación de CG15828 en *Drosophila* y lo nombró Lipid Transfer Particle (LTP) (Palm et al., 2012). Por ello a partir de este punto nos referiremos a CG15828 también como LTP.

En el resto de resultados de esta tesis, vamos a caracterizar la función del LTP en el metabolismo lipídico de *Drosophila melanogaster*.

## **2.1 Validación de la interacción entre Lpr2E y el LTP mediante experimentos de pull-down.**

Para validar la interacción entre el LTP y las isoformas de los receptores de lipoforinas que median la toma de lípidos decidimos realizar ensayos de pull-

down. Para ello dirigimos la expresión de los transgenes *UAS-lpr2E-TAP* y *UAS-lpr2F-TAP* en las glándulas salivares de larvas estadio III gracias a la línea activadora *ab1-Gal4*. Después de preparar los extractos de las glándulas salivares, separamos los receptores de lipoforinas mediante una matriz magnética (dynabeads) conjugada a IgG de conejo. Los receptores de lipoforinas que hemos sobreexpresado se unen a esta matriz ya que contienen un dominio proteína A en la secuencia TAP. Después de los lavados pertinentes de la matriz (ver métodos), se analizó el eluido por western blot mediante un anticuerpo que detecta el LTP (anticuerpo cedido por el laboratorio de S. Eaton) (figura 28). Observamos que el LTP se une a la isoforma Lpr2E y no a la isoforma Lpr2F, confirmando por tanto los resultados obtenidos previamente mediante la técnica TAP.

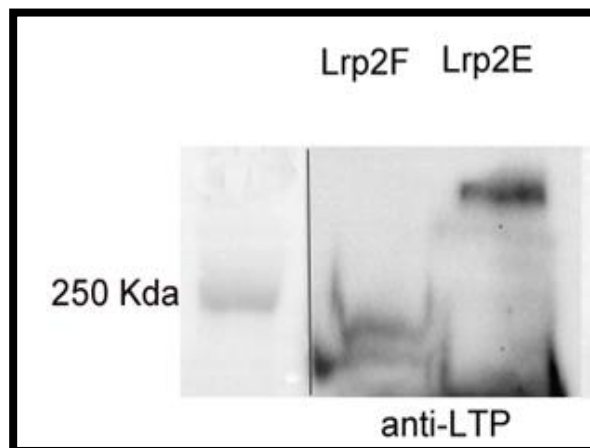


Figura 28: Western blot donde se observa el resultado del experimento de pull-down de los receptores de lipoforina y el LTP. Se precipitaron Lpr2F-TAP y Lpr2E-TAP de extractos de ovarios mediante dynabeads conjugadas a IgG. Mediante un anticuerpo anti-LTP observamos la unión del LTP a la isoforma Lpr2E, la cual media la toma de lípidos; y la ausencia de unión a la isoforma Lpr2F, incapaz de mediar la toma de lípidos.

## **2.2 Patrón de expresión de *ApoLTP* y distribución de la proteína.**

Para analizar el papel del LTP en *Drosophila* se comenzó por conocer su patrón de expresión. El ARNm de *ApoLTP* se sintetiza exclusivamente en el cuerpo graso, tal y como se ve por hibridación in situ en embriones (BDGP, figura 29 y (Palm et al., 2012)) y por el análisis del ARNm de distintos tejidos mediante chips de expresión (FlyAtlas, figura 30). FlyAtlas indica expresión en otros tejidos además del cuerpo graso. Ello puede deberse a la contaminación de las muestras por cuerpo graso adyacente en el caso del corazón o la espermateca. En el caso de la cabeza, ésta contiene gran cantidad de cuerpo graso.

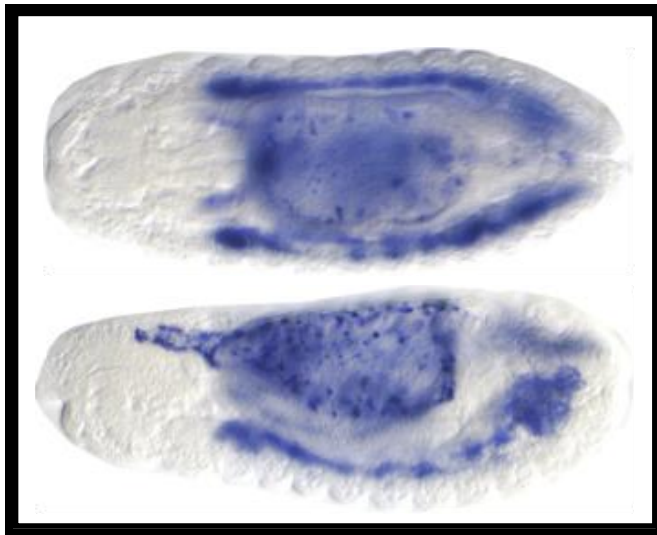


Figura 29: Hibridación in situ en embriones, que muestra que el ARNm de *apoLTP* se sintetiza exclusivamente en el cuerpo graso. Imagen obtenida de la base de datos BDGP.

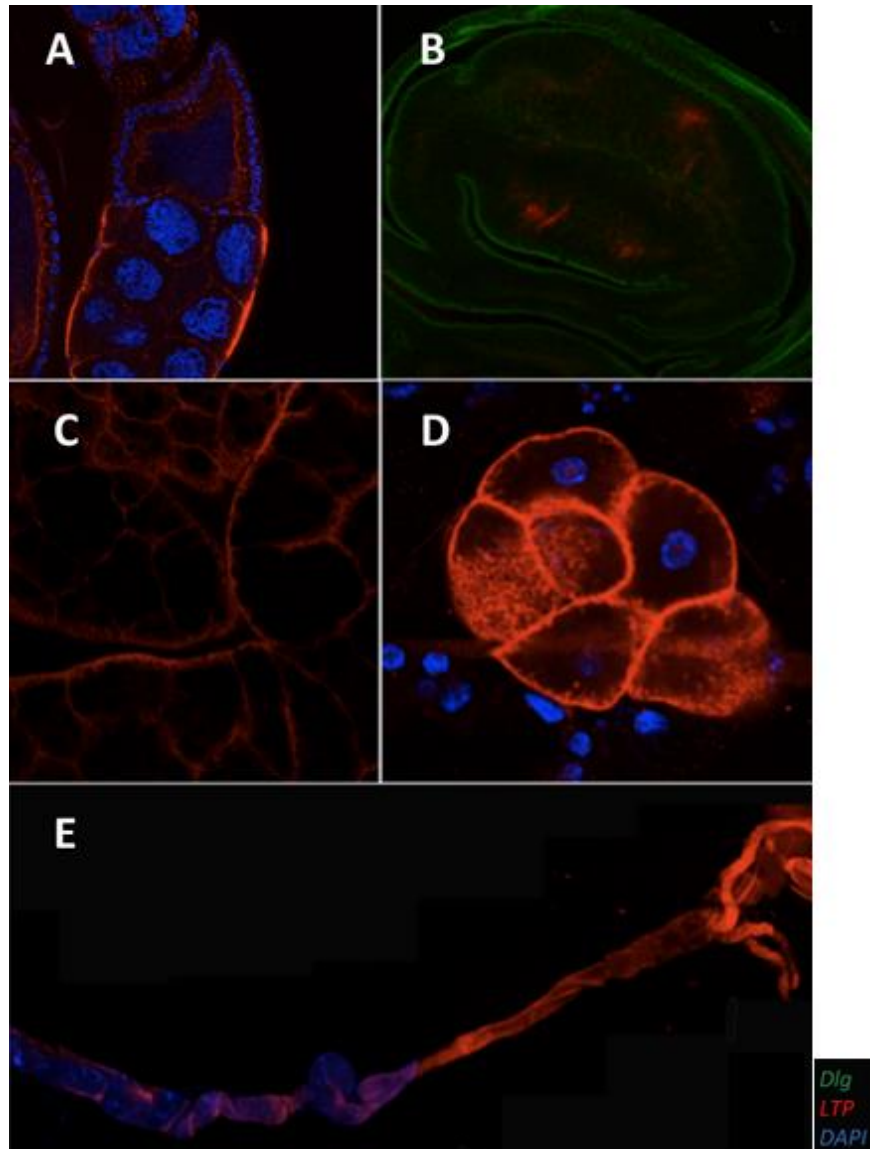
Tissue	mRNA Signal	Present Call	Enrichment	Affy Call
Brain	140 ± 5	4 of 4	0.50	Down
Head	875 ± 28	4 of 4	3.00	Up
Eye	543 ± 79	4 of 4	1.87	Up
Thoracoabdominal ganglion	129 ± 3	4 of 4	0.40	Down
Salivary gland	18 ± 4	1 of 4	0.06	Down
Crop	44 ± 3	4 of 4	0.20	Down
Midgut	7 ± 1	0 of 4	0.00	Down
Tubule	34 ± 9	3 of 4	0.10	Down
Hindgut	105 ± 5	4 of 4	0.40	Down
Heart	1384 ± 50	4 of 4	4.78	Up
Fat body	2684 ± 246	4 of 4	9.26	Up
Ovary	2 ± 1	0 of 4	0.00	Down
Testis	10 ± 1	3 of 4	0.00	Down
Male accessory glands	12 ± 1	0 of 4	0.00	Down
Virgin spermatheca	2079 ± 113	4 of 4	7.18	Up
Mated spermatheca	2395 ± 167	4 of 4	8.27	Up
Adult carcass	1359 ± 74	4 of 4	4.70	Up
Larval CNS	50 ± 6	4 of 4	0.17	Down
Larval Salivary gland	62 ± 10	4 of 4	0.22	Down
Larval midgut	10 ± 1	2 of 4	0.04	Down
Larval tubule	8 ± 1	1 of 4	0.00	Down
Larval hindgut	56 ± 10	4 of 4	0.20	Down
Larval fat body	430 ± 30	4 of 4	1.50	Up
Larval trachea	27 ± 18	4 of 4	0.09	Down
Larval carcass	20 ± 4	4 of 4	0.07	Down
S2 cells (growing)	245 ± 10	4 of 4	0.85	None
Whole fly	289 ± 25	4 of 4		

Figura 30: Tabla donde se muestran los niveles de expresión del gen *ApoLTP*, basada en el análisis del ARNm de distintos tejidos mediante chips de expresión. Datos obtenidos de FlyAtlas.

Para estudiar la distribución de la proteína se usaron dos técnicas. De un lado se usó un anticuerpo que se une específicamente al LTP. Por otro lado, empleamos la cepa de *Drosophila P[LTP-myc]* creada en el laboratorio, en la que se había introducido un BAC genómico que contiene el gen *ApoLTP* fusionado a seis copias del epítipo myc y controlado por las regiones reguladoras endógenas (E. Parra). Ello permite visualizar LTP-myc mediante un anticuerpo anti-myc.

Usando estas herramientas observamos una acumulación de LTP en el cuerpo graso, su lugar de síntesis. También se observó acumulación en los oenocitos, en el intestino y en los discos imaginales. Todos estos órganos están relacionados con el metabolismo lipídico. Los oenocitos sintetizan ceras e hidrocarburos para la formación de la cutícula, así como ácidos grasos de cadena muy larga. El intestino es el principal órgano para la absorción de lípidos y los discos imaginales acumulan cantidades substanciales de lípidos neutros (figuras 31 y 32).

Figura 31: (A) Ovarios, donde se observa acumulación de LTP en las membranas de las células nutricias. (B) disco imaginal de ala larvario, donde se ve la acumulación del LTP en la parte distal del disco. (C) cuerpo graso larvario, donde se ve acumulación en las membranas. (D) oenocitos larvarios, donde se observa LTP en las membranas. (E) intestino adulto de *Drosophila*, donde se observa la acumulación de LTP en los divertículos gástricos y en el intestino medio. En todos los casos usamos el anticuerpo  $\alpha$ -LTP (rojo). Los núcleos se marcaron con DAPI, en azul (A, D y E). Dlg se usó como marcador del contorno de la membrana del disco imaginal de ala, en verde (B).



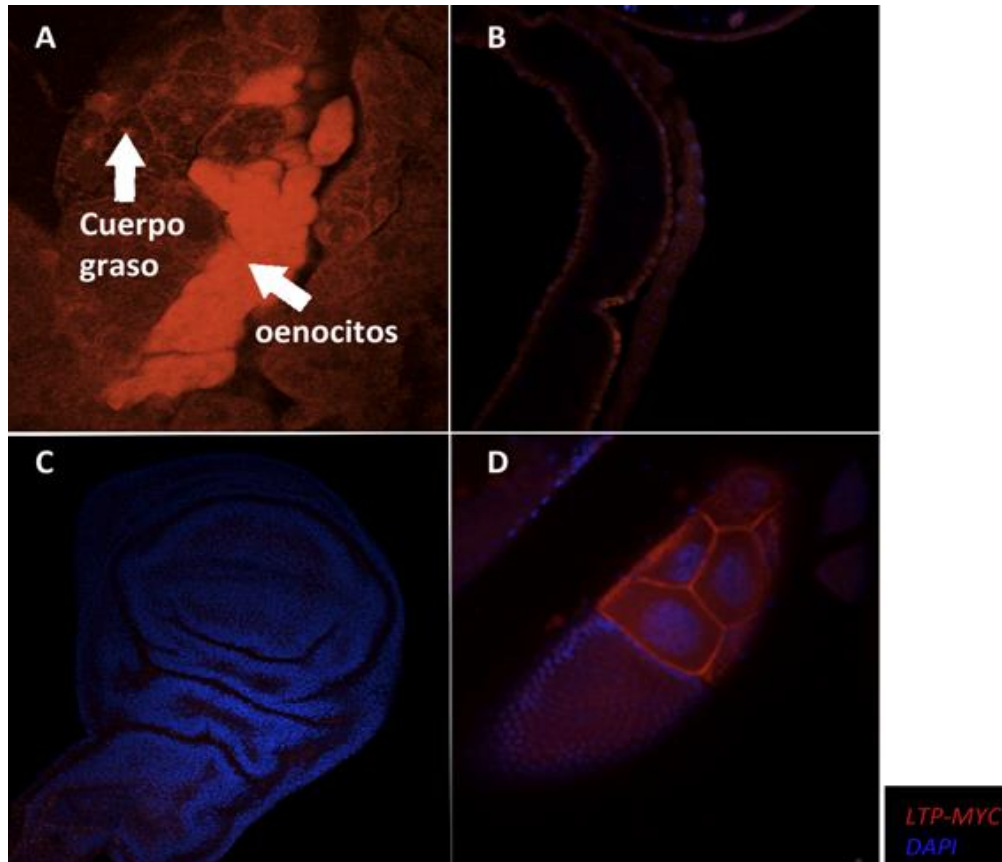


Figura 32: Distribución de LTP-myc (rojo) en distintos tejidos de la cepa transgénica *P[LTP-myc]*. (A) Oenocitos y cuerpo graso adulto, donde se observa la acumulación del LTP-myc en membranas del cuerpo graso. Los oenocitos emiten mucha autofluorescencia, lo que dificulta distinguir si la señal del anticuerpo es específica. (B) Intestino larvario, donde se acumula LTP-myc en los enterocitos. (C) Disco imaginal de ala larvario, no observamos tinción de LTP-myc. (D) Ovario donde se observa la expresión de LTP-myc en las membranas de las células nutricias. En todos los casos usamos el anticuerpo  $\alpha$ -myc (en rojo). Se usó DAPI para marcar núcleos (B, C y D).

Es importante mencionar que las tinciones del LTP endógeno con el anticuerpo  $\alpha$ -LTP son más fuertes que en la cepa *P[LTP-myc]* con el anticuerpo  $\alpha$ -myc. Por ejemplo, no fuimos capaces de detectar acumulación de LTP-myc en el disco imaginal con el anticuerpo anti-myc, pero si con el anticuerpo  $\alpha$ -LTP que detecta el LTP endógeno. Probablemente esta diferencia se debe a que la construcción *P[LTP-myc]* se expresa en menores niveles que el gen *ApoLTP* endógeno.

### 2.3 Generación de mutantes de falta de función para el gen *apoLTP*.

Con el objetivo de estudiar la función de la proteína LTP, generamos mutaciones de falta de función en este gen. Gracias a la base de datos flybase de *Drosophila* (<http://flybase.org/>) observamos que existían cinco cepas de *Drosophila* que contenían elementos transponibles P insertados en la región del promotor de *apoLTP*. Al estar varios de estos elementos P insertados en posiciones muy próximas, analizamos sólo dos de estas cepas (*P(GSV6)GS11380* y *P(GSV6)GS13572*) con la intención de ver si correspondían a mutantes de pérdida de función (figura 33).

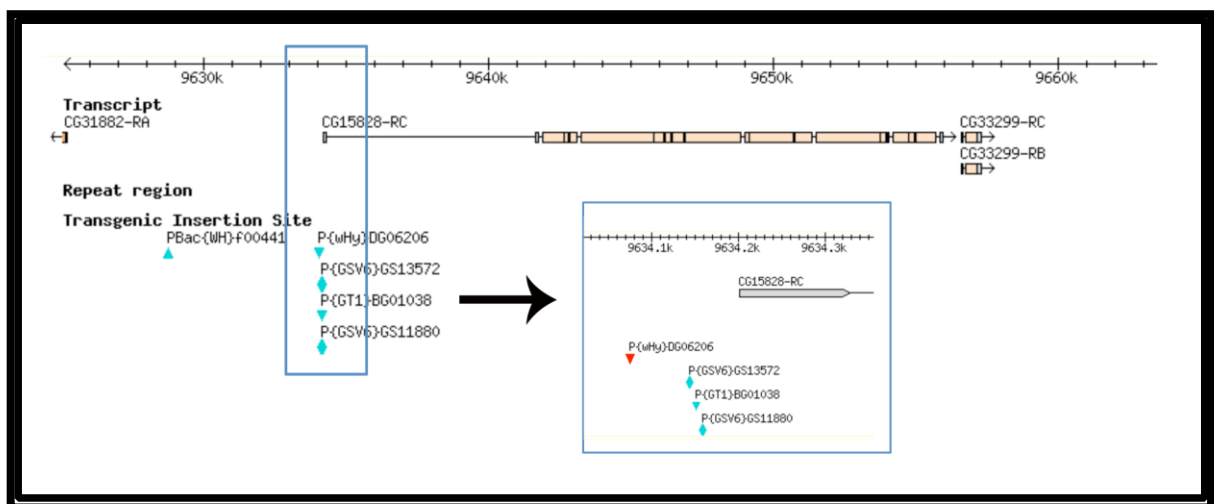


Figura 33: Mapa genómico del gen *apoLTP* (CG15828) en el cual se pueden ver los 5 elementos P próximos al promotor y la localización del elemento *P(wHy)DG06206* usado para generar el mutante de pérdida de función del gen *apoLTP*.

Ninguna de las dos cepas mostraba un fenotipo de letalidad o esterilidad en homocigosis, sugiriendo que no son mutantes nulos. Por ello, decidimos crear una nueva mutación mediante la escisión imprecisa del elemento *P(wHy)DG06206*, también insertado en la zona promotora. Los elementos

transponibles de tipo P(wHy) fueron diseñados para facilitar la generación de deleciones (Huet et al., 2002). Consisten en un elemento transponible P que a su vez contiene un elemento transponible hobo en su interior, flanqueado por los marcadores genéticos *yellow* (*y*) y *white* (*w*) (figura 34). Al movilizar el elemento hobo, se pueden producir escisiones precisas (sólo se pierde el transposón hobo) o bien imprecisas (al saltar hobo, se lleva parte de la zona flanqueante y ó *w*, dependiendo de la dirección).

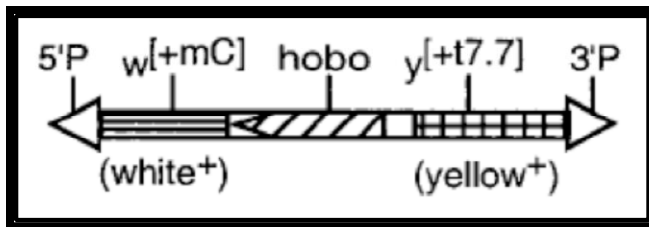


Figura 34: Estructura del elemento P(wHy), el cual consiste en un elemento transponible hobo flanqueado por dos marcadores genéticos, *white* y *yellow*.

Caracterizamos los cromosomas resultantes de la movilización del elemento hobo en tres pasos. Primero se seleccionaron aquellos cromosomas que perdieron el marcador *yellow*, presentes en el extremo del elemento P(wHy) más cercano al gen *apoLTP* (figura 35) (cruces descritos en materiales y métodos). De todos los cromosomas que perdieron el marcador (646), identificamos uno que resultó ser letal en homocigosis y que por tanto era probablemente un mutante en el gen *apoLTP*.



Figura 35: estructura del elemento *P(wHy)DG06206*, el cual ha perdido la región del marcador *yellow* y la zona anexa del gen en el cual estaba insertado.





Tras este paso, obtuvimos un fragmento mayoritario que se secuenció en su totalidad. En el tercer y último paso de caracterización, identificamos la zona genómica que corresponde a la secuencia obtenida mediante el programa Blast (figura 37).

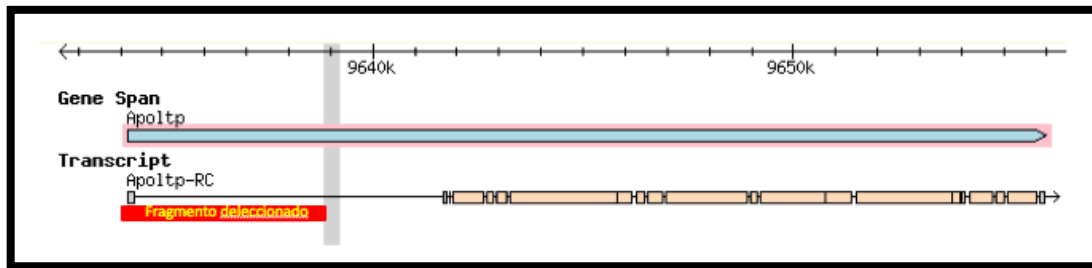


Figura 37: Mapa genómico del gen *apoLTP* (CG15828) donde se representa la zona delecionada en el mutante que generamos, representada por la barra de color rojo. En sombreado se puede ver la región secuenciada mediante iPCR, que es la parte del gen flanqueante con la parte delecionada

Vimos que en la cepa de mosca generada se eliminaba el promotor del gen *apoLTP*, un exón no codificante y gran parte del primer intrón. Es por tanto muy probable que se trate de un mutante nulo. Llamamos a esta nueva mutación *apoLTP[excDG06206]*.

Como ya hemos comentado, este nuevo mutante es letal en homocigosis. Para caracterizar el periodo de letalidad lo balanceamos con un cromosoma CyO-GFP que dirige la expresión de la proteína GFP en las larvas. No pudimos detectar ninguna larva mutante que hubiera llegado al estadio tres, indicando que la letalidad se producía durante el primer o segundo estadio larvario. Además, el desarrollo se enlentecía considerablemente, de forma que los animales permanecían en el estadio larvario por más de diez días antes de morir. Observamos también un comportamiento letárgico de las larvas mutantes.

Para comprobar si la letalidad era debida exclusivamente al gen *apoLTP*, se diseñó un experimento de rescate. Este experimento consistió en combinar la deficiencia generada en *apoLTP*, en el cromosoma 2, con la línea *P[LTP-myc]*,

en el cromosoma 3. El BAC *P[LTP-myc]* contiene el gen *apoLTP* fusionado al epítipo myc y bajo el control de las zonas reguladoras propias de *ApoLTP*. Observamos animales adultos homocigotos para la deficiencia, indicando un rescate completo mediado por el BAC *P[LTP-myc]*. Por tanto demostramos que la letalidad era debida a la deficiencia del gen LTP y no a otro posible gen afectado (figura 38).

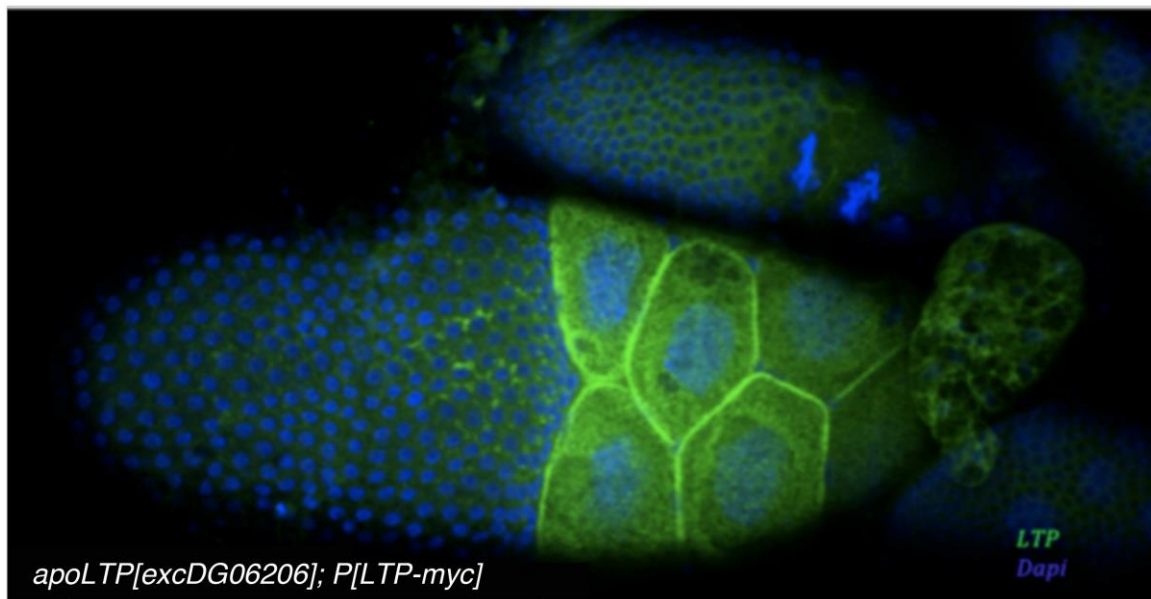


Figura 38: Imagen de un ovario de *Drosophila* de una hembra homocigota para la deficiencia *apoLTP[excDG06206]*, nula para *apoLTP*, que lleva una copia del BAC *P[LTP-myc]* en el tercer cromosoma. *P[LTP-myc]* rescata la letalidad de la deficiencia de *apoLTP*. Además, las hembras son fértiles y la morfología de los ovarios normal, como se observa en la foto. LTP-myc se muestra en verde y el DAPI en azul.

## **2.4 Caracterización funcional del LTP en *Drosophila*. Fenotipos de falta de función de *apoLTP*.**

Debido a la letalidad temprana del mutante de falta de función del gen *apoLTP*, emprendimos una aproximación alternativa para estudiar su fenotipo de falta de función, silenciando el gen mediante ARN interferente. Para ello expresamos un transgén, el *UAS-LTP-ARNi* mediante la línea activadora *FB-Gal4*, que dirige la expresión en el cuerpo graso, lugar de síntesis del LTP. Decidimos examinar los órganos de la mosca involucrados en la adquisición de lípidos de la dieta y en su acumulación. Por ello analizamos el intestino así como dos órganos que acumulan lípidos y que habían sido caracterizados en el laboratorio en el pasado, los ovarios y los discos imaginales. Después de silenciar *apoLTP*, nos encontramos con una acumulación de lípidos neutros masiva en el intestino, detectados mediante el colorante lipofílico Nile red, y una gran disminución en ovarios y también en discos imaginales, aunque menos extrema que en caso de los ovarios (figura 39). Estos resultados indican que el LTP participa en el transporte de lípidos neutros, esto es, se requieren tanto para la transferencia de los lípidos desde el intestino a las lipoproteínas como desde las lipoproteínas a los ovarios y discos imaginales.

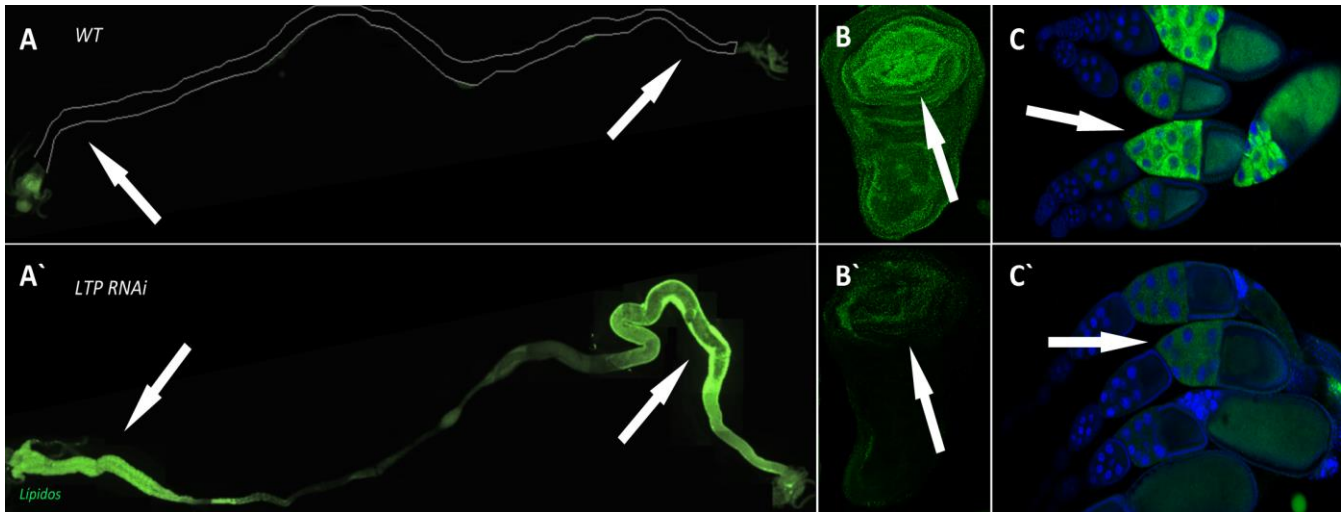
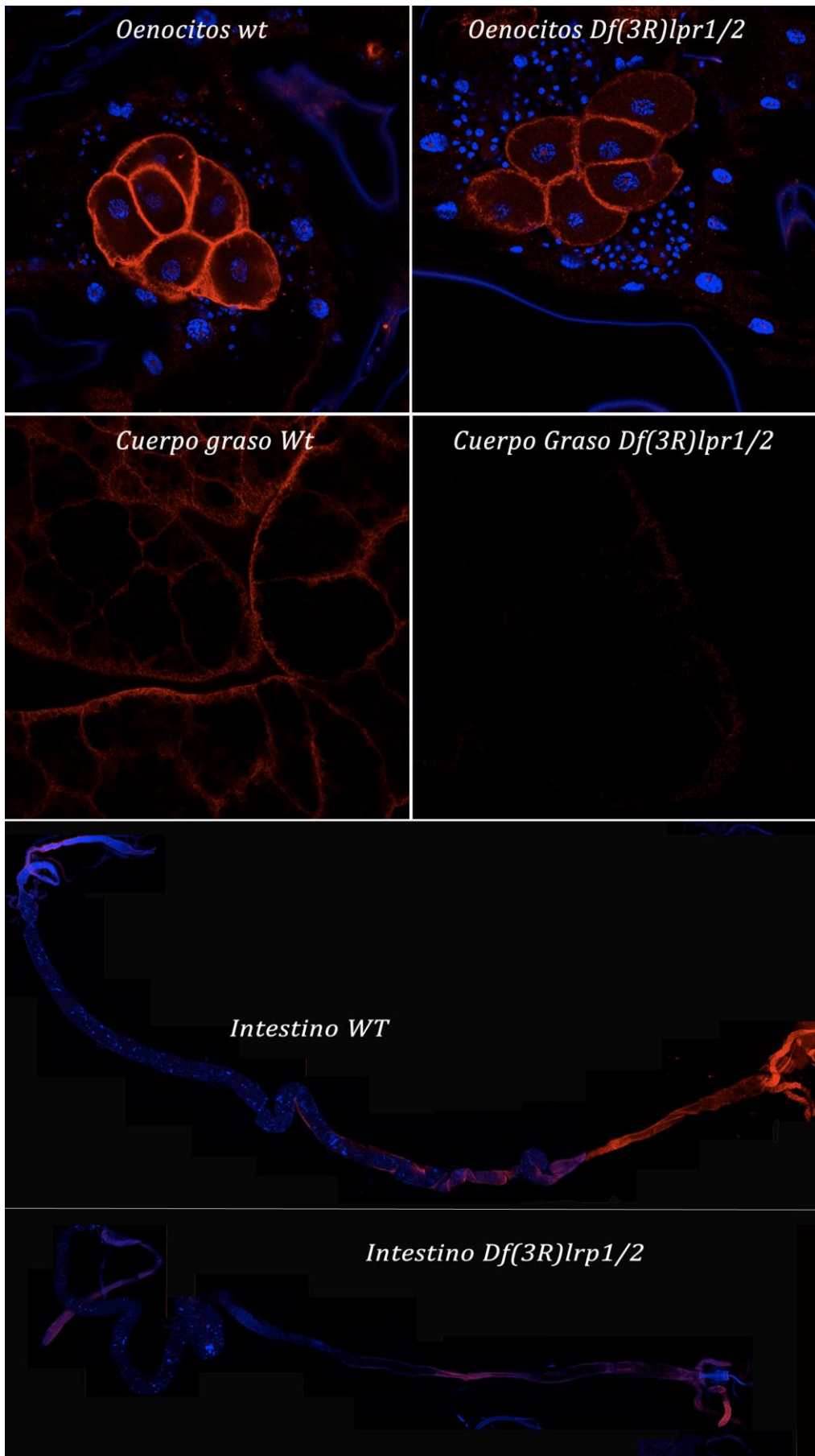


Figura 39: (A y A') Imágenes de intestinos de *Drosophila* en las cuales podemos ver que los intestinos silvestres (wt) (A) presentan mucha menor cantidad de lípidos, mientras que los intestinos de las moscas con *apoLTP* silenciado (A') se observa una gran cantidad de lípidos. (B-C') Por otro lado en ovarios y discos imaginales se observa una alta concentración de lípidos en mosca silvestres (wt) (B y C), mientras que en las moscas donde el LTP está silenciado (B' y C'), vemos una disminución muy importante de estos lípidos. Lípidos marcados con Nile red y los núcleos con DAPI. Las flechas indican los lugares de acumulación de lípidos.

## 2.5 Relevancia funcional de la interacción LTP-receptores de lipoforinas.

Un aspecto esencial del metabolismo lipídico en *Drosophila* es la transferencia de los lípidos desde la lipoforina a los diferentes órganos como los discos imaginales u ovarios. Estudios previos demostraron que los receptores de lipoforina son clave para este proceso (Parra-Peralbo and Culi, 2011). Teniendo en cuenta que nuestros datos indican que el LTP también desempeña un papel crítico en el metabolismo lipídico, el siguiente paso fue discernir si la unión del LTP a estos receptores era necesaria para la consiguiente toma de lípidos. Para ello, en primer lugar estudiamos si la acumulación del LTP en intestino, discos imaginales, cuerpo graso, oenocitos y ovarios dependía de los receptores de lipoforinas, examinando animales silvestres y en fondo mutante

*Df(3R)lpr1/2*, nulo para *lpr1* y *lpr2*. Para ello se analizó el LTP endógeno y también en algunos casos, el *P[LTP-myc]* transcrito desde el BAC genómico descrito anteriormente, mediante los anticuerpos  $\alpha$ -LTP y  $\alpha$ -Myc respectivamente (figura 40a y 40b ). Con el anticuerpo  $\alpha$ -LTP, vimos que en el intestino, cuerpo graso, oenocitos, ovarios y discos imaginales de ala había mayor cantidad de LTP en fondo silvestre que en el fondo *Df(3R)lpr1/2* (figura 36a). Analizando el *P[LTP-myc]* vimos, como en el caso anterior, un aumento de acumulación de LTP en fondo silvestre frente al fondo *Df(3R)lpr1/2* en todos los órganos descritos anteriormente excepto en los discos imaginales. En este caso fue imposible detectar el LTP tanto en el control como en el mutante. Creemos que ello es debido a que la construcción *P[LTP-myc]* se expresa a bajos niveles y por tanto su detección con  $\alpha$ -Myc tiene menos sensibilidad que en el caso anterior usando  $\alpha$ -LTP (figura 40b).





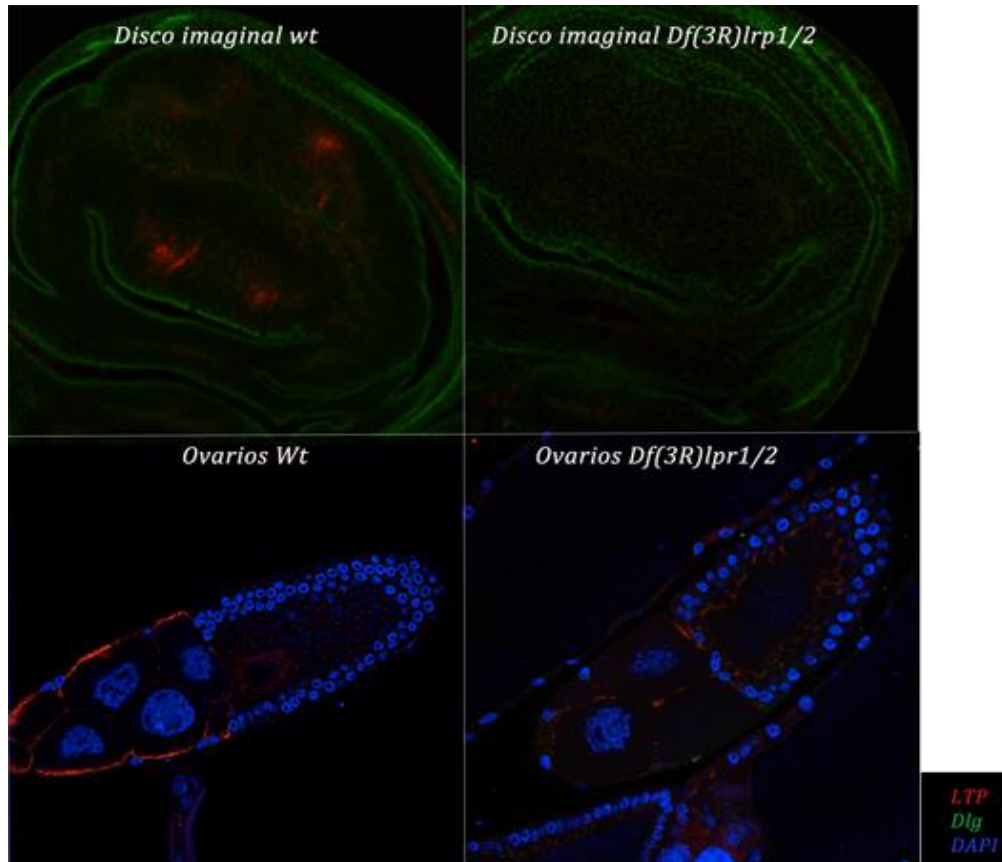


Figura 40a: Imágenes de diferentes tejidos donde se compara la distribución de LTP en fondo silvestre (wt) y en fondo *Df(3R)lpr1/2*. En todos los casos se observa mayor cantidad de LTP en fondo silvestre. Usamos el anticuerpo  $\alpha$ -LTP para detectar el LTP endógeno y DAPI para teñir los núcleos de los ovarios, oenocitos, e intestinos. La membrana de los discos imaginales de ala se marcó con Dlg.



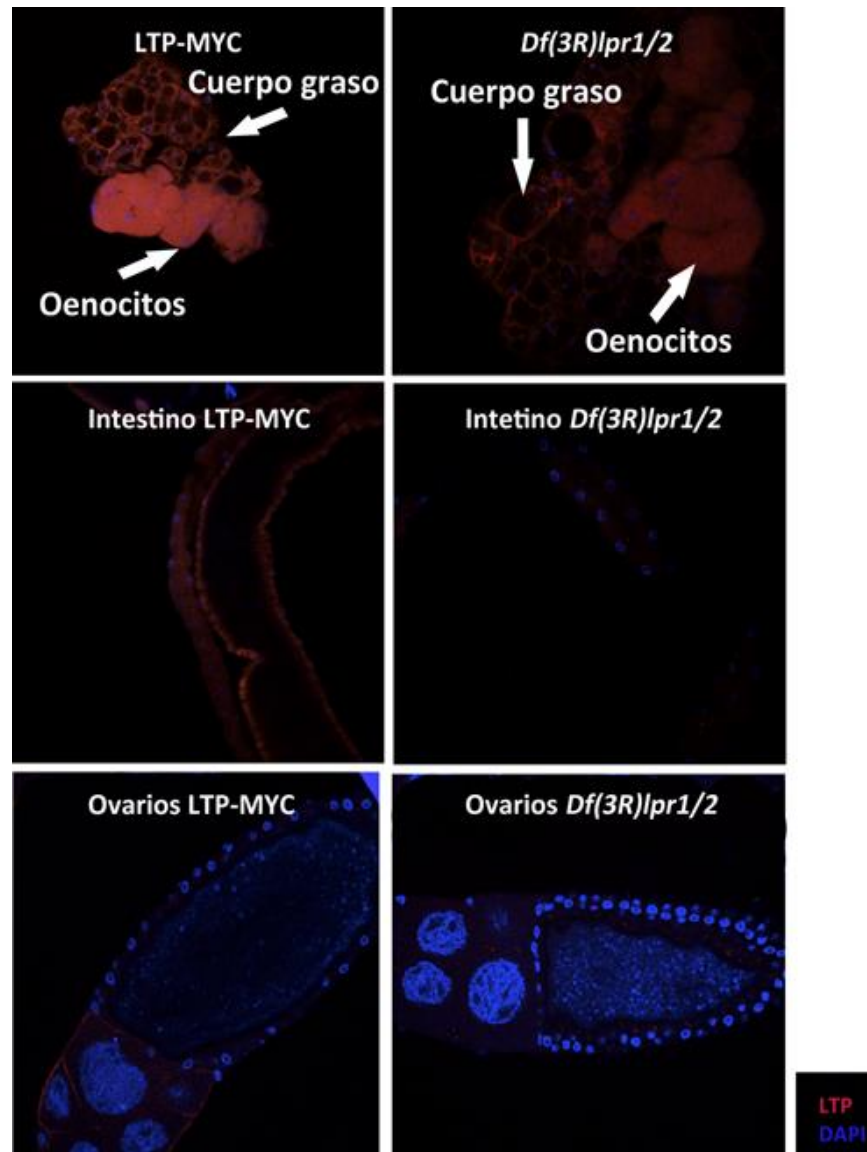


Figura 40b: Imágenes de diferentes tejidos de animales que llevan el BAC genómico *P[LTP-myc]* donde se compara la distribución de LTP en fondo silvestre para los receptores de lipoforinas y en fondo *Df(3R)lpr1/2*. En todos los casos se observa mayor cantidad de LTP-myc en fondo silvestre. Usamos el anticuerpo  $\alpha$ -myc para detectar el LTP-myc y DAPI para teñir los núcleos de los diferentes tejidos.

Examinamos con mayor detalle el requerimiento de los receptores de lipoforinas para la acumulación de LTP en los ovarios. En particular, hay que tener en cuenta que en la deficiencia *Df(3R)lpr1/2* la mayoría de los folículos

degeneran en estadio 10, antes de que la acumulación de LTP sea robusta. Por ello analizamos la distribución de LTP-myc en los ovarios silvestres, en la deficiencias *Df(3R)lpr1/2*, la cual carece tanto de *lpr1* como de *lpr2*, en la deficiencia *Df(3R)lpr2*, la cual carece del receptor *lpr2*, y en la combinación transalélica *Df(3R)lpr2 / Df(3R)lpr1-2*. En los ovarios silvestres, como ya se ha descrito anteriormente, se detecta LTP-myc recubriendo las membranas de las células nutricias. Esta acumulación desaparece en los ovarios *Df(3R)lpr1/2*. Igualmente, en el caso de ovarios mutantes para *lpr2* observamos una disminución drástica de LTP-myc, indicando que *Lpr2* es el principal receptor que media la acumulación de LTP en las células nutricias de los folículos. Analizamos también la combinación alélica más fuerte para los receptores de lipoforinas que no produce degeneración de los folículos: la deficiencia del *lpr2* sobre la doble deficiencia. En este caso también observamos una disminución fuerte en la cantidad del LTP-myc acumulado con respecto a los ovarios control (figura 41). Esta disminución es comparable a la observada en la *Df(3R)lpr2*, indicando que *Lpr1* probablemente no juegue ningún papel en la acumulación del LTP en la superficie de las células nutricias. En la ausencia de los receptores de lipoforinas, a veces se observa una acumulación de LTP en las zonas de contacto entre dos células nutricias. Al ser el LTP una proteína que circula en la hemolinfa, es probable que se trate de proteína LTP residual que quedó atrapada entre los pliegues de las membranas durante la fijación.

En su conjunto, estos resultados sugieren que el LTP se une a los receptores de lipoforinas in vivo, ayudando e interviniendo en la toma de lípidos.

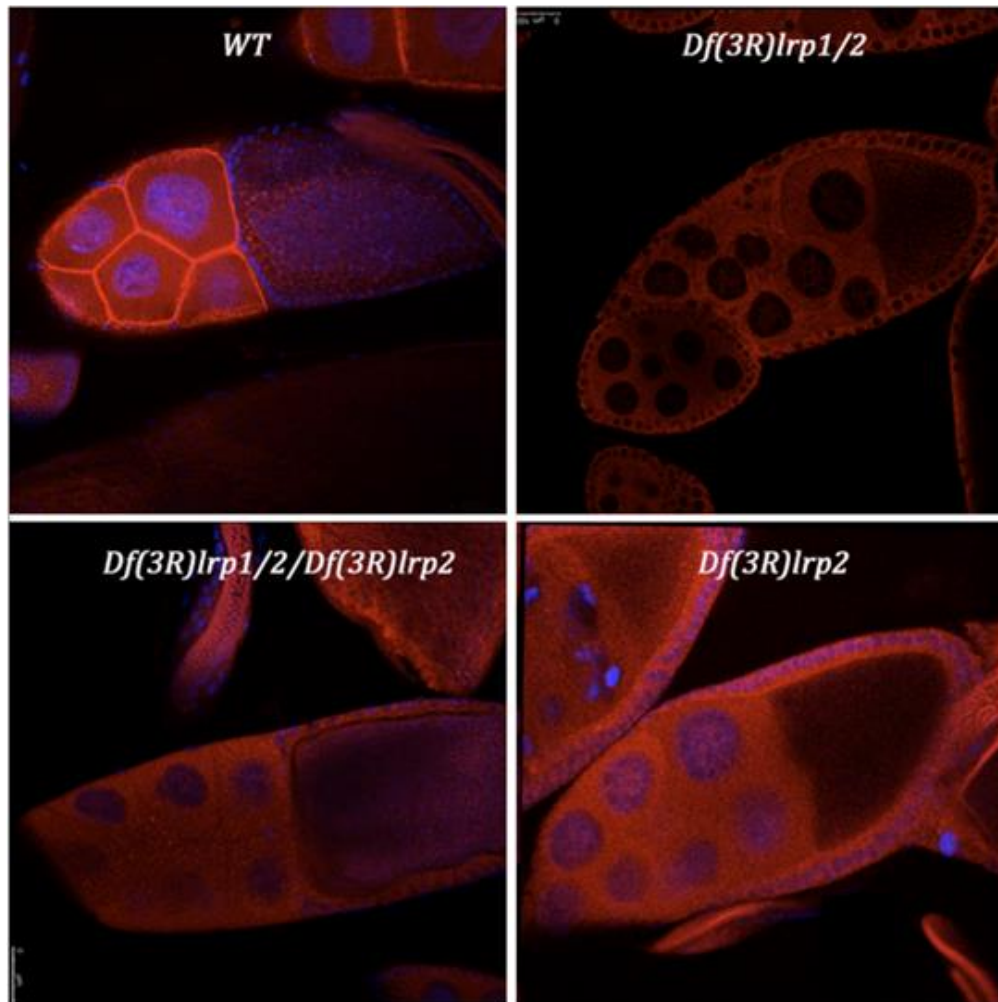


Figura 41: Imágenes de ovarios de una cepa de *Drosophila* que llevan el BAC genómico *P[LTP-myc]* donde se observa acumulación de LTP-myc exclusivamente en los ovarios silvestres, mientras que en los ovarios deficientes para los receptores de lipoforinas no se observa acumulación de LTP en la membrana. *Df(3R)lrp1/2* es deficiente para *lpr1* y *lpr2*; *Df(3R)lpr2*, para *lpr2* y *Df(3R)lrp1/2/Df(3R)lpr1*, sólo tiene una copia funcional de *lpr1*. En todos los casos se usó el anticuerpo  $\alpha$ -Myc para detectar el LTP-Myc y DAPI para teñir los núcleos de las células de los ovarios.

En una aproximación complementaria, decidimos analizar el efecto de la sobreexpresión de las distintas isoformas de los receptores de lipoforinas sobre la acumulación del LTP. En primer lugar sobreexpresamos las isoformas Lpr2E y Lpr2F en el compartimento posterior del disco imaginal de ala de *Drosophila*, usando la línea activadora *en-gal4*. Este experimento se realizó en un fondo genético silvestre para los receptores de lipoforinas. Al sobreexpresar la

isoforma Lpr2E en el compartimento posterior del disco imaginal de ala se observaba un aumento en la cantidad del LTP en dicho compartimento frente al compartimento anterior. En el caso de la isoforma Lpr2F, no se observaba ningún cambio en la distribución de LTP (figura 42).

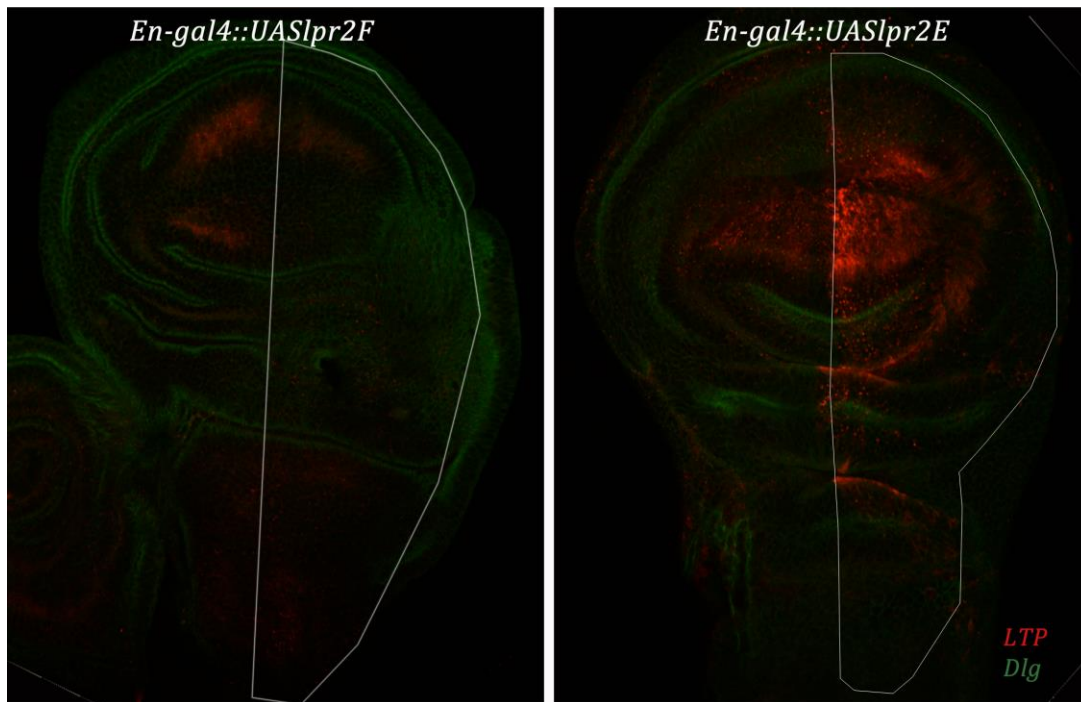


Figura 42: Imágenes de discos imaginales de ala, en los cuales se ha sobreexpresado en el compartimento posterior diferentes isoforma de *lpr2*. En el disco imaginal en el que se ha sobreexpresado la isoforma Lpr2F no se observa cambio en la distribución de LTP (en rojo) con respecto al compartimento anterior. En el disco imaginal el cual se ha sobreexpresado la isoforma Lpr2E se observa aumento de la cantidad de LTP con respecto al compartimento anterior. El contorno celular se ha teñido con  $\alpha$ -Dlg, en verde. La región delimitada con una línea blanca indica la zona de sobreexpresión

Para ver si este efecto es general u ocurre sólo en tejidos específicos, decidimos examinar también las células foliculares del ovario. Para ello sobreexpresamos los receptores de lipoforinas en clones de células, usando la construcción *act<y<Gal4* como línea activadora. Mediante un transgén *UAS-GFP*

podimos identificar aquellas células que sobreexpresan los receptores, siendo las células vecinas que no expresan GFP el control negativo. Este experimento se realizó en fondo *Df(3R)lpr1/2*, es decir, en ausencia de los receptores de lipoforinas endógenos. Observamos que la sobreexpresión de Lpr2E (isoforma capaz de mediar la toma de lípidos) en clones de células foliculares aumenta la cantidad de LTP en sus membranas celulares. Esto no ocurre cuando el receptor sobreexpresado es Lpr2F (isoforma incapaz de mediar la toma de lípidos) (figura 43).

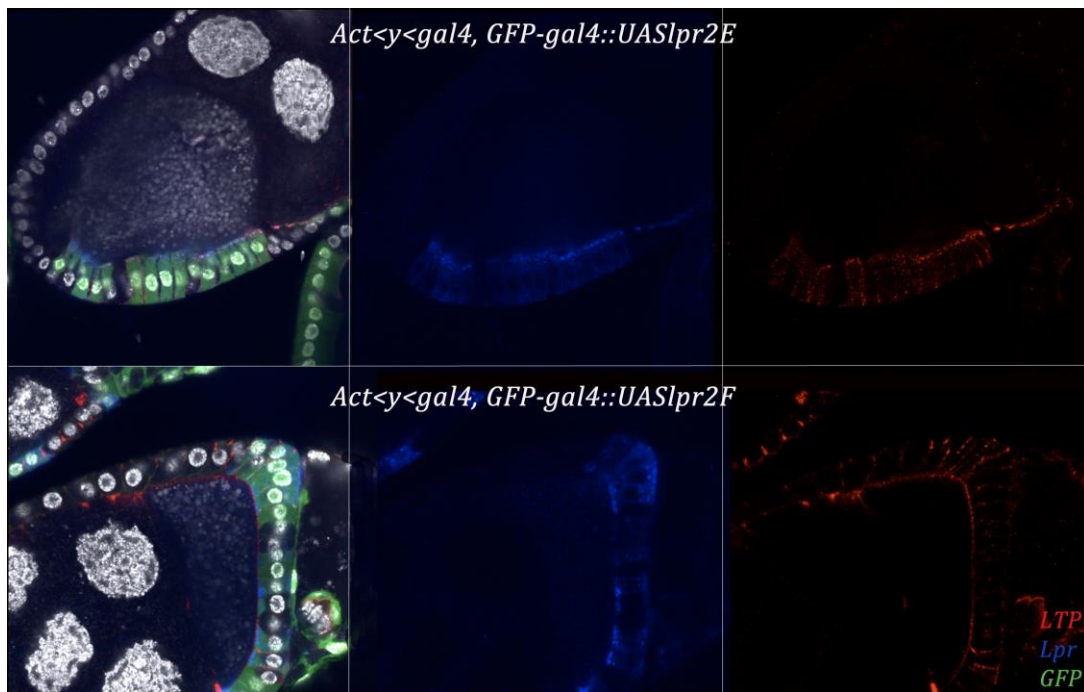


Figura 43: Imágenes de ovarios de *Drosophila* homocigotos para la *Df(3R)lpr1/2*, en los cuales se han sobreexpresado las isoformas Lpr2E y Lpr2F en un número reducido de células foliculares (clones). Dichos clones se identifican por la expresión de GFP. Se observa una mayor acumulación de LTP en las membranas de las células que expresan la isoforma Lpr2E, la cual media la toma de lípidos. La sobreexpresión de Lpr2F no tiene un efecto sobre la distribución de LTP. En azul se observan los receptores de lipoforinas sobreexpresados, en rojo el LTP y en verde se observa la expresión de GFP. Los núcleos se muestran en blanco en el primer panel.

Hasta aquí hemos examinado el papel de las isoformas del gen *lpr2* en la estabilización del LTP. Quisimos saber si la correspondencia entre isoforma que media la toma de lípidos y la estabilización del LTP se mantenía para las isoformas del gen *lpr1*. Para ello sobreexpresamos en discos imaginales las isoformas Lpr1H y Lpr1J que son capaces de mediar la toma de lípidos y la isoforma Lpr1M, que no lo es, mediante la línea activadora *ap-gal4*. Observamos cómo las isoformas Lpr1H y Lpr1J aumentan la cantidad de LTP en las membranas celulares así como su endocitosis. Por el contrario la isoforma Lpr1M no afecta a la distribución de LTP en el disco imaginal (figura 44).

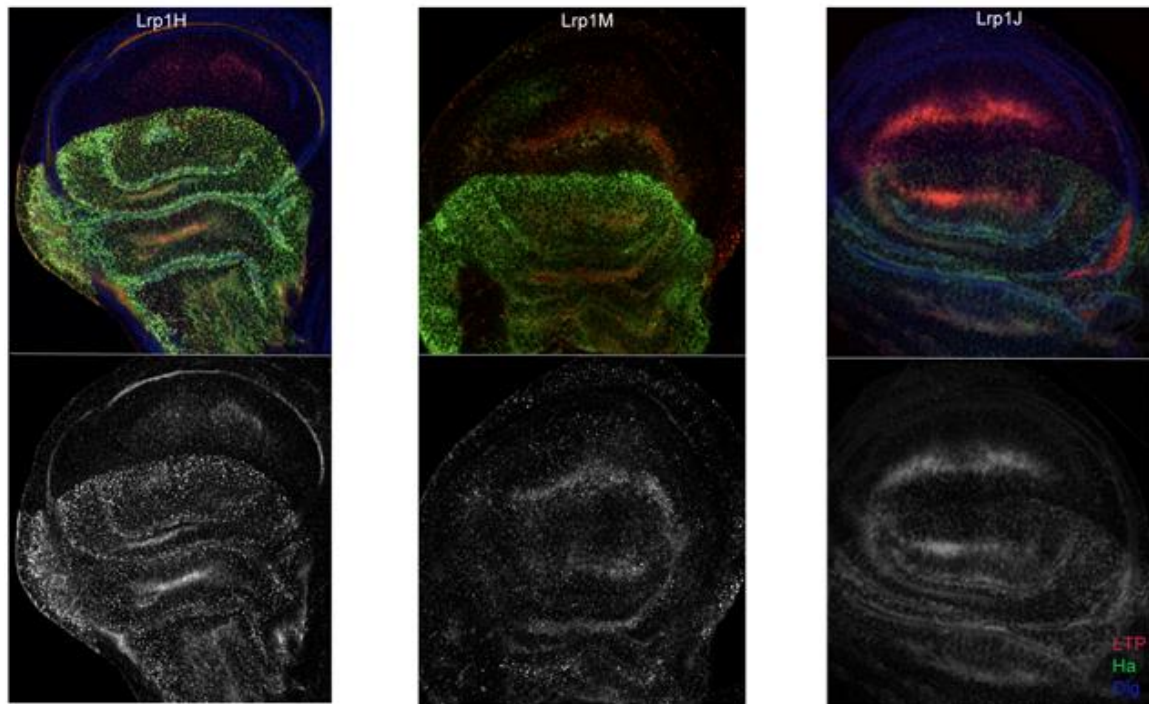


Figura 44: Imágenes de discos imaginales de ala que sobreexpresan las isoformas Lpr1H, Lpr1M y Lpr1J. Se puede observar como las isoformas Lpr1H y Lpr1J estabilizan el LTP en la membrana. La isoforma Lpr1M es incapaz de producir dicha estabilización. La sobreexpresión de los receptores de lipoforina se produce en un fondo de total ausencia para estos (*Df(3R)lpr1/2*) El LTP se detectó con  $\alpha$ -LTP y los receptores de lipoforina con  $\alpha$ -HA.



De este modo determinamos in vivo que las isoformas de los genes *lpr1* y *lpr2* que median la toma de lípidos, también inducen la estabilización del LTP en la membrana. Por el contrario, las isoformas que no median la toma de lípidos, no promueven dicha estabilización.

## **2.6 La concentración de LTP en la hemolinfa no parece estar regulada por mecanismos de retroalimentación.**

Es sabido que hay proteínas que tienen la capacidad de regular homeostáticamente su concentración en el organismo en función de su concentración, manteniendo así sus niveles estables. Nos planteamos si la concentración de LTP en la hemolinfa estaba regulado por su propia concentración o por la actividad de los receptores de lipoforinas, que podrían actuar como receptores de tipo "scavenger", eliminando el LTP circulante. Para ello, usamos una cepa que contienen una inserción de un transgén *P[LTP-myc]* controlado por los elementos reguladores endógenos. Ello permite distinguir el LTP sintetizado a partir de este transgén, que lleva el epítipo myc, del LTP endógeno que no está marcado. Se comparó mediante western blot la hemolinfa extraída de organismos *P[LTP-myc]* homocigotos, los cuales tienen dos copias del gen *ApoLTP* endógeno y dos copias del transgén *LTP-myc* (cuatro copias totales), frente a la de organismos *apoLTP[excDG06206]; P[LTP-myc]*, los cuales son deficientes para el gen endógeno, teniendo sólo las dos copias del transgén *LTP-myc*. Detectamos el LTP mediante el anticuerpo  $\alpha$ -Myc. Vimos que la cantidad de LTP-myc circulante no era significativamente diferente entre ambos genotipos a pesar de que una de las cepas tiene el doble de copias del gen *apoLTP*. Ello permite concluir que el LTP no regula su propia concentración en el organismo.

A continuación examinamos si los receptores de lipoforinas regulaban la cantidad de LTP circulante. Se comparó la concentración de LTP-myc en la

hemolinfa de organismos mutantes para los receptores de lipoforinas (*Df(3R)lpr1/2*), frente a organismos silvestres para estos receptores. En ambos casos las cepas contenían dos copias del transgén *P[LTP-myc]*. Se observó que la cantidad de LTP-myc circulante era similar, descartando que los receptores de lipoforinas regulasen la cantidad de LTP (figura 45).

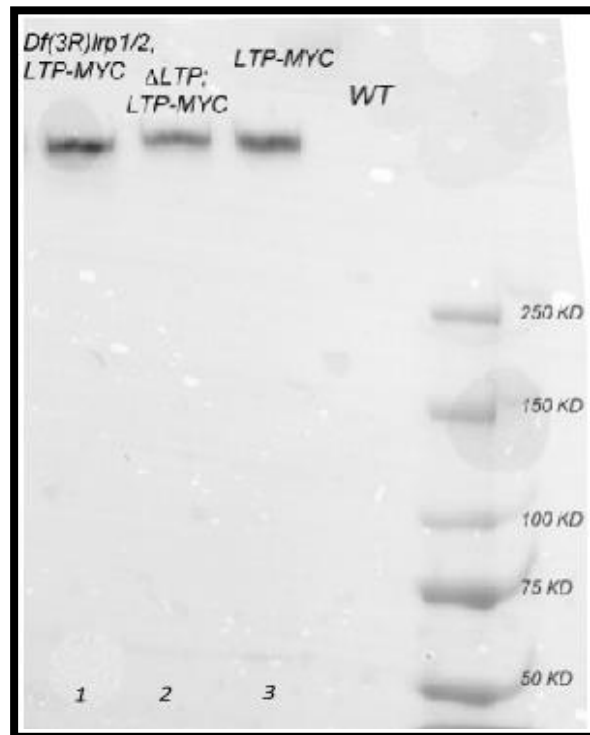


Figura 45: Western blot en el cual se detecta el LTP-myc en diferentes stocks todos los cuales, excepto el control silvestre (wt), llevan dos copias de un transgén *LTP-myc*. En el carril 1, mutante *Df(3R)lpr1/2*, en el que ambos receptores de lipoforinas están deletados. En el carril 2, mutante *apoLTP[excDG06206]*, nulo para *apoLTP*. En el carril 3, control positivo silvestre para los genes *lpr1*, *lpr2* y *apoLTP* y conteniendo dos copias del gen *apo-LTP* endógeno. En el carril 4, control negativo (wt) que no contiene el transgén *P[LTP-myc]*. Para la detección se usó el anticuerpo  $\alpha$ -Myc.

Por tanto podemos concluir que ni la transcripción de *apoLTP* ni la estabilidad de la lipoproteína LTP dependen de su concentración en la hemolinfa. Los receptores de lipoforinas no regulan la cantidad de LTP



circulante, por lo que probablemente no actúen como receptores de tipo "scavenger".

## **2.7 Mapeo de los dominios proteicos de los receptores de lipoforinas necesarios para su interacción con el LTP**

Una vez determinado a que tipos de isoformas se une el LTP, nos planteamos mapear los dominios proteicos requeridos para esta interacción. Para ello utilizamos una serie de construcciones quiméricas generadas previamente en el laboratorio y que consisten fundamentalmente en la isoforma Lpr2F a la que se le añadieron dominios específicos de la isoforma Lpr2E. De este modo tenemos la quimera Lpr2F+LA1, la cual lleva el módulo LA1 de la isoforma Lpr2E. La quimera Lpr2F+NCN, la cual lleva la región no conservada presente en el extremo N terminal de la isoforma Lpr2E y la quimera Lpr2F+LA1+NCN, la cual lleva los dos dominios descritos anteriormente (figura 46). Estas quimeras permitieron descubrir que el módulo LA1 de Lpr2E era crítico para el proceso de toma de lípidos (Parra-Peralbo and Culi, 2011) (figura 13).

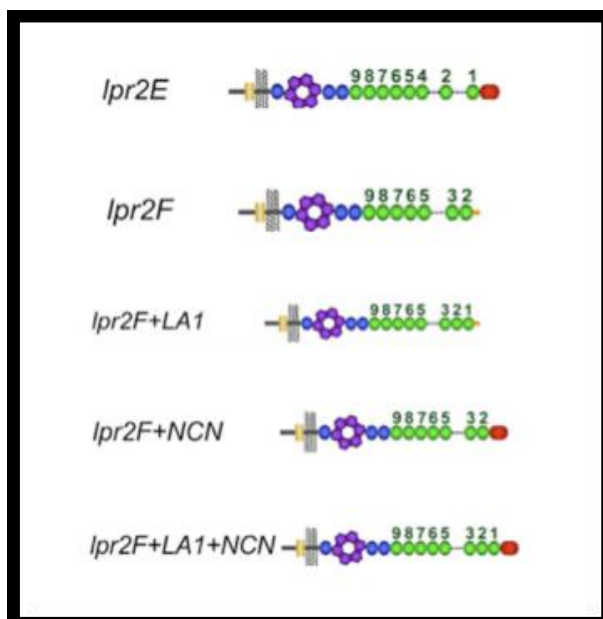


Figura 46: Esquema de las isoformas Lpr2E y Lpr2F juntos con las quimeras Lpr2F+LA1, Lpr2F+NCN y Lpr2F+LA1+NCN. En rojo viene señalada la región N-terminal no conservada (NCN) y mediante un 1 se indica el módulo LA1.

Para conocer los dominios requeridos para la interacción con el LTP, sobreexpresamos las diferentes quimeras así como los recetores nativos en el disco imaginal, usando para ello la línea activadora *ap-Gal4*, y analizamos su capacidad para estabilizar LTP en la superficie de las células. Ya hemos descrito anteriormente que la isoforma Lpr2E era capaz de estabilizar el LTP en la membrana, mientras que la isoforma Lpr2F no tenía esta capacidad.

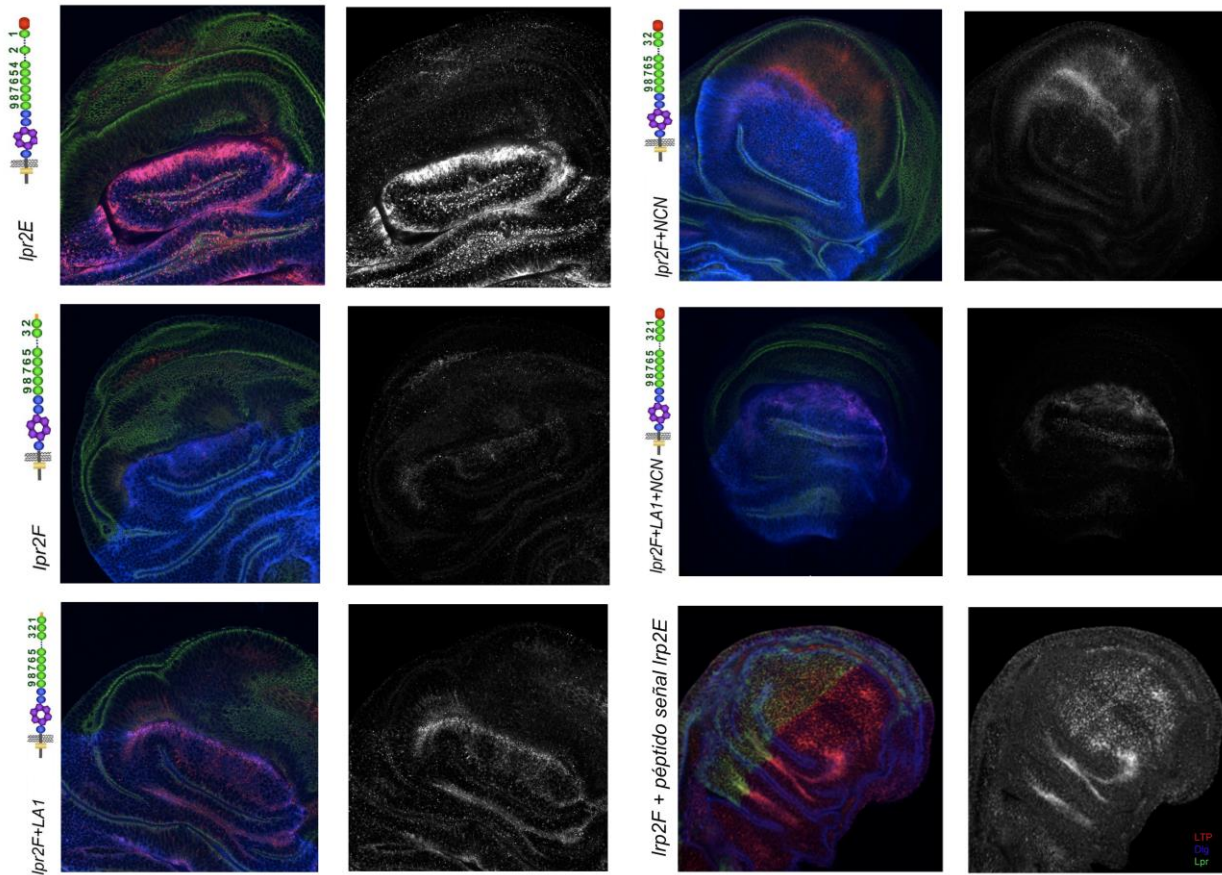


Figura 47: Imágenes de discos imaginales de *Drosophila* en los que se sobreexpresan las isoformas Lpr2E, Lpr2F y distintas quimeras, según se indica. Se puede observar en estas imágenes cómo las quimeras Lpr2F+LA1 y Lpr2F+LA1+NCN son capaces de mediar la acumulación de LTP en la membrana al igual que ocurre con la isoforma Lpr2E. Mientras que las quimeras Lpr2F+NCN no es capaz de mediar la acumulación de LTP, al igual que ocurre con la isoforma Lpr2F. Se usó el driver *ap-gal4* para dirigir la expresión de estas quimeras. En el caso de la quimera Lpr2F con el péptido señal de Lpr2E, se observa como su sobreexpresión no produce estabilización del LTP. En este caso, se usó la línea activadora *hh-gal4*. El LTP se detectó con  $\alpha$ -LTP y las quimeras con  $\alpha$ -HA.

La sobreexpresión de la quimera Lpr2F+NCN, que contiene la región no conservada N-terminal de la isoforma Lpr2E, no produjo un aumento de la cantidad de LTP en la región de sobreexpresión. Por el contrario, al sobreexpresar tanto la quimera Lpr2F+LA1 como Lpr2F+LA1+NCN, se observó un aumento en la cantidad de LTP en la región de *ap-Gal4* (figura 47) si bien en el caso de Lpr2F+LA1 el efecto es más suave que el observado con la isoforma Lpr2E. Por otro lado examinamos una quimera de la isoforma Lpr2F a la cual se le añadió el péptido señal de la isoforma Lpr2E, inusualmente grande (quimera generada por Miriam Rodríguez). Observamos que su sobreexpresión no incrementaba la cantidad de LTP en las células. Por tanto el péptido señal de la isoforma Lpr2E no confiere capacidad para interaccionar con el LTP (figura 47).

En otra aproximación, sobreexpresamos in vivo las diferentes quimeras y receptores de lipoforinas, pero en condiciones en las que bloqueamos la endocitosis gracias a un alelo termosensible de *shibire* (*shi<sup>ts</sup>*, homólogo de la Dinamina) (Grigliatti et al., 1973). Se ha descrito que en este alelo la endocitosis está bloqueada a la temperatura no permisiva de 33°C y como consecuencia de esto, hay una pérdida de vesículas intracelulares (Kosaka and Ikeda, 1983). Al bloquear la endocitosis, los receptores y sus ligandos se acumulan en las membranas y por tanto producen una mayor señal en una tinción inmunohistoquímica.

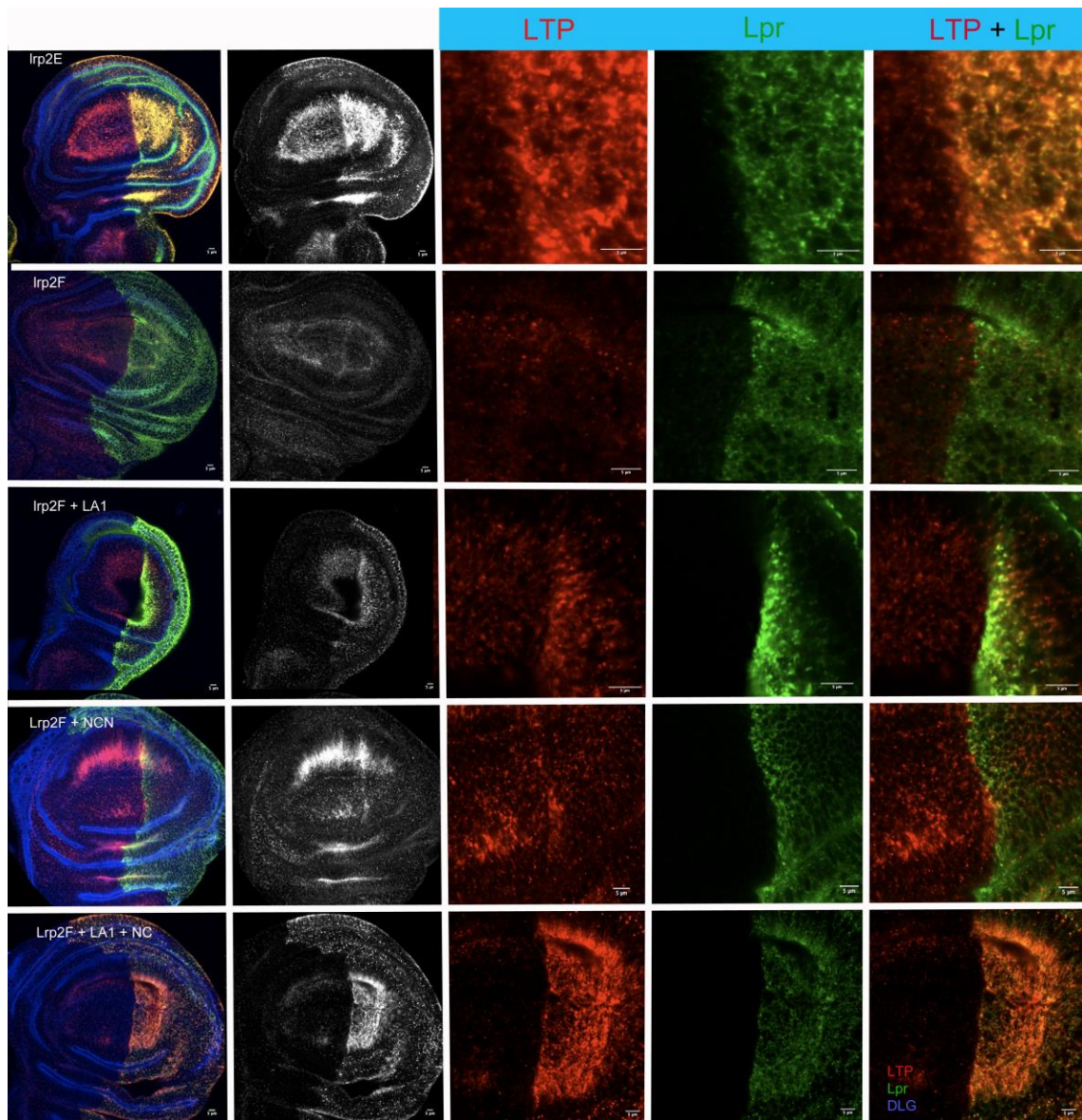


Figura 48: Discos imaginales de ala en los cuales se ha bloqueado la endocitosis inactivando el alelo termosensible *shi<sup>ts</sup>*. Se observa que las quimeras Lrp2F+LA1 y Lrp2F+LA1+NCN se estabiliza el LTP en la membrana, al igual que ocurre en la isoforma Lrp2E. La quimera Lrp2F+NCN no estabiliza el LTP en la membrana, al igual que ocurre con la isoforma Lrp2F. Se observa como en la isoforma Lrp2E se producen una acumulación de LTP en la membrana colocalizando con la expresión de los receptores. Esto no se observa en la isoforma Lrp2F. Los receptores de lipoforina se sobreexpresaron usando la línea activadora *hh-Gal4*. El LTP se detectó con  $\alpha$ -LTP (rojo), los receptores de lipoforina y sus quimeras se detectaron con  $\alpha$ -HA (verde),  $\alpha$ -DLG (azul) marca las membranas de los discos imaginales. Cada fila se corresponde con una isoforma o quimera. Las tres últimas columnas se corresponden a una magnificación del tejido donde se separan los diferentes canales como se indica en la imagen.

Observamos un aumento de LTP en la región donde sobreexpresamos el receptor Lpr2E, pero no así con la isoforma Lpr2F. Al igual que en el experimento anterior, observamos estabilización del LTP en las quimeras Lpr2F+LA1 y Lpr2F+LA1+NCN. Por el contrario, con la quimera Lpr2F+NCN no se observa esta acumulación de LTP en la región de sobreexpresión (figura 48).

En su conjunto, nuestros experimentos indican que todas las isoformas de *lpr1* y *lpr2* que median la toma de lípidos también promueven la estabilización del LTP en la membrana plasmática. Por el contrario, las isoformas que no median la toma de lípidos no son capaces de ello. Por otro lado, hemos observado que el módulo LA1 es fundamental para la interacción con el LTP ya que aunque por sí mismo sólo produce un pequeño aumento de afinidad, las quimeras e isoformas que carecen de este módulo no interaccionan en absoluto con el LTP. Por otro lado, se ha descrito que el módulo LA1 es también esencial para mediar la toma de lípidos. Ello sugiere fuertemente que la acumulación de LTP en las membranas plasmáticas mediada por los receptores de lipoforinas que contienen el módulo LA1 es una parte crítica del proceso de toma de lípidos.

# *DISCUSIÓN*





La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, se ha convertido en los últimos años en un organismo modelo muy valorado en estudios de metabolismo en general y también de metabolismo de lípidos. Ello es posible ya que existe una considerable conservación de las diferentes rutas de señalización que regulan el metabolismo energético desde *Drosophila* hasta humanos (Baker and Thummel, 2007; Bharucha, 2009; Kuhnlein, 2010; Leopold and Perrimon, 2007; Padmanabha and Baker, 2014; Schlegel and Stainier, 2007). Esto ha posibilitado el desarrollo de potentes herramientas y rastreos génicos que han dado como resultado la identificación de nuevos genes básicos para el entendimiento del metabolismo lipídico y su regulación (Hader et al., 2003).

Un componente relevante en el metabolismo lipídico en *Drosophila* son los receptores de lipoforinas ya que estos son necesarios para la adquisición de lípidos por parte de las células de los discos imaginales y en las células nutricias de los ovarios (Parra-Peralbo and Culi, 2011). Durante este trabajo hemos buscado otras proteínas que junto a los receptores de lipoforinas, estén involucradas en la ruta de toma de lípidos para de este modo comprender mejor este proceso en *Drosophila melanogaster*.

### **Identificación de la Lipid Transfer Protein (LTP), una nueva lipoproteína en *Drosophila*.**

Para realizar una búsqueda de proteínas potencialmente involucradas en la ruta de toma de lípidos nos centramos en los receptores de lipoforinas como eje de esta ruta y buscamos proteínas que interaccionaran con dichos receptores. Para ello usamos la técnica del TAP (Tandem affinity purification), una técnica basada en la purificación de proteínas aprovechando su capacidad de interaccionar con otras proteínas (Rigaut et al., 1999). La técnica TAP se ha revelado como una potente herramienta para el estudio a gran escala de



complejos multiproteicos (Dziembowski and Seraphin, 2004; Puig et al., 2001; Rohila et al., 2004).

Como resultado de nuestros experimentos, aislamos ApoLTP como una proteína que interaccionaba con la isoforma Lpr2E, que media la toma de lípidos. Por el contrario, ApoLTP no interaccionaba con la isoforma Lpr2F, incapaz de mediar la toma de lípidos. Ello sugiere que ApoLTP está involucrada en la ruta de toma de lípidos celular, mediante su interacción con los receptores de lipoforinas (Figuras 23, 26 y 28).

La proteína apoLTP pertenece a la familia de las Large Lipid Transfer Proteins (LLTP) que se caracterizan por tener un módulo LLT (Large Lipid Transfer, por sus siglas en inglés), también conocido como dominio vitelogenina, que a su vez es el único módulo que está conservado en toda la familia (Smolenaars et al., 2007). Este módulo, de unos 900 aminoácidos, es un dominio de unión a lípidos (Smolenaars et al., 2007). La familia LLTP está compuesta por tres grandes subgrupos, tipo MTPs, tipo ApoB y tipo Vitelogenina (Vtg). Las proteínas MTP se ha descrito que actúa favoreciendo la biosíntesis de algunas lipoproteínas. Así, el MTP juega un papel esencial en la lipidación y la secreción de CM y VLDL en mamíferos (Hussain et al., 2003). La subfamilia tipo ApoB participan en el transporte de lípidos como constituyentes esenciales de lipoproteínas. Por ejemplo, ApoB-48 es el componente mayoritario de los CM en humanos (Young et al., 1995). El tercer miembro de la familia de LLTP es el tipo Vtg, con una función de reserva y almacenamiento de lípidos en los oocitos de insectos y otras especies ovíparas (Kawooya and Law, 1988) (figura 49).

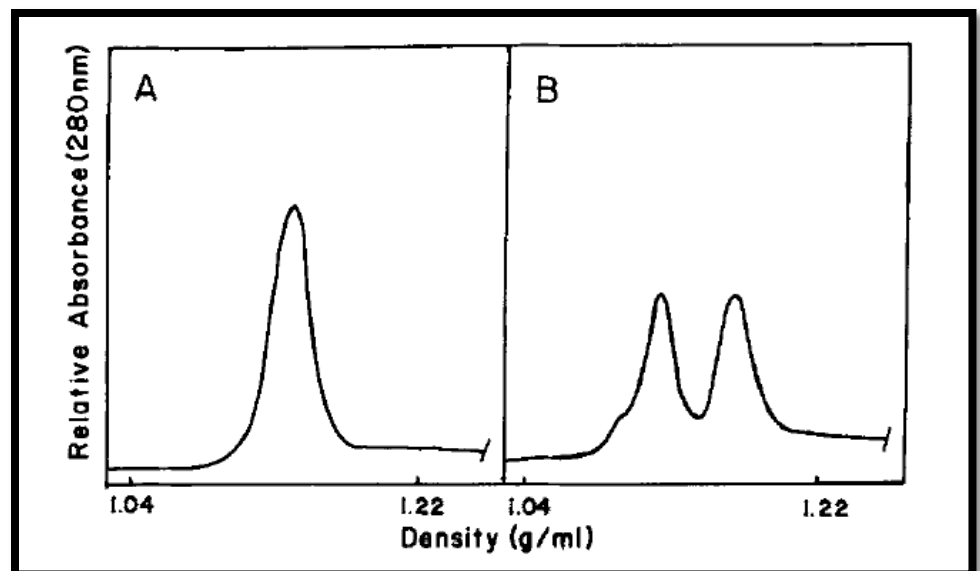


ocurriera transferencia de lípidos entre ellas. Sin embargo, al añadir a la mezcla hemolinfa de la que previamente se habían eliminado las lipoforinas, se producía una transferencia neta de lípidos desde las LDLp a las HDLp, formándose una nueva partícula de densidad intermedia. Estos experimentos pioneros mostraron por primera vez que la hemolinfa de los insectos contenía un factor capaz de mediar la transferencia de lípidos entre lipoforinas y que por ello se llamó Lipid Transfer Protein (LTP) (Ryan et al. 1986a). Posteriormente, el LTP se purificó por primera vez de la hemolinfa de *M. sexta*. Para ello se separaron las proteínas de la hemolinfa según su densidad por ultracentrifugación y se examinaron las distintas fracciones para identificar aquellas que mantenían la capacidad de mediar la transferencia de lípidos in vitro (figura 50). Se vio que la fracción que tenía esa actividad contenía una lipoproteína de densidad 1.23 g/ml y que por tanto, se correspondía con el LTP (Ryan et al., 1986b). La caracterización del LTP mostró que contenía tres apolipoproteínas, ApoLTP-I, ApoLTP-II y ApoLTP-III y que tenía un peso molecular de  $1 \times 10^6$  Da (Ryan et al., 1986a). En estudios posteriores se describió como el LTP tenía la capacidad de redistribuir lípidos entre lipoforinas en varias especies de insectos y entre distintos tipos de lipoproteínas, incluyendo el LDL humano, in vitro (Ryan et al., 1988a; Ryan et al., 1986a; Ryan et al., 1988b; Ryan et al., 1986b). Se examinó también la participación del LTP en la transferencia de lípidos entre las lipoforinas y tres tejidos involucrados en el metabolismo lipídico: el cuerpo graso, el intestino medio y los ovarios. En estos experimentos se cultivaban in vitro explantes de estos tejidos junto con lipoforinas purificadas de la hemolinfa, estando marcados radioactivamente los lípidos ya sea del tejido o de la lipoforina. Como el LTP permanecía unido a los tejidos a pesar de extensos lavados, los autores bloquearon su función mediante la incubación del tejido con anticuerpos neutralizantes anti-LTP. La incubación de los explantes con la lipoforina se realizaba en presencia o ausencia de LTP purificado y se examinaba la transferencia de radioactividad. Mediante experimentos de este tipo, se vio que el LTP se requería para la transferencia de DAG desde el cuerpo graso a la lipoforina (Van Heusden and Law, 1989), desde el intestino a la

lipoforina (Canavoso and Wells, 2001; Yun et al., 2002) y para la toma de lípidos por los oocitos, siendo fundamental para su desarrollo (Jouni et al., 2003; Liu and Ryan, 1991).

Se han propuesto dos mecanismos de acción para el LTP y su función de transferencia de lípidos; el primero sería mediante la formación de un complejo ternario, en el que la transferencia de lípidos es mediada a través de un complejo formado por la unión del donante, el aceptor de lipoproteínas y el catalizador de la transferencia, es decir el LTP. El segundo mecanismo consistiría en la transferencia por un mecanismo portador en el que el catalizador actúa como un servicio de transporte de lípidos entre el donante y el aceptor de lípidos, sin la necesidad de la formación de un complejo entre ambos. El mecanismo más aceptado es el de tipo portador. Ello se vio en experimentos en los que el LTP era capaz de mediar la transferencia de lípidos entre lipoforinas que habían sido inmovilizadas en un soporte de Sefarosa, impidiéndose por tanto la formación de un complejo trimérico. Según este modelo, el LTP adquiriría primero lípidos del donante y los transferiría posteriormente al receptor, de forma secuencial (Blacklock et al., 1992).

Figura 50: Ensayos de transferencia de lípidos in vitro. Las gráficas muestran la distribución de lipoforinas según su densidad. Inicialmente, se mezclaron lipoforinas de dos distintas densidades purificadas a partir de animales adultos y de larvas, ambas pertenecientes a *M. sexta*. Después de incubar la mezcla de lipoforinas por una hora, los autores observaron que las



dos especies de lipoforinas no se habían alterado (B). Sin embargo, cuando a la mezcla añadieron una pequeña cantidad de LTP purificado, observaron una única especie de densidad intermedia después de la incubación (A), debido a que el LTP media el intercambio de lípidos entre lipoforinas (Ryan et al., 1986b).

Más recientemente, el grupo de S. Eaton describió la identificación y caracterización del LTP en *Drosophila*. En este trabajo vio que el LTP es una lipoproteína de alta densidad y de baja abundancia en la mosca, similar a lo conocido en otros insectos. Contiene dos apolipoproteínas, ApoLTP-I y ApoLTP-II, aunque no encontró ApoLTP-III como en el resto de especies de insectos descritas. Sin embargo, tampoco se pudo descartar su presencia debido a la baja abundancia del LTP en mosca. Mediante la expresión de un transgén *apoLTP-RNAi* que generaron en su laboratorio, silenciaron este gen en el cuerpo graso y vieron que su falta de función llevaba a una acumulación de lípidos en el intestino. Por ello, propusieron que el LTP se requiere para la transferencia de lípidos desde el intestino a las lipoforinas. El desarrollo larvario se ve afectado en mutantes *apoLTP* nulos que generaron, sólo observándose individuos en estadios tempranos, de manera similar a los mutantes en la MTP. La acumulación de lípidos en el intestino causado por la pérdida de LTP parece idéntica a la causada por la pérdida de MTP o Lpp (Palm et al., 2012).

Nosotros hemos generado una nueva mutación en el gen *apoLTP* de *Drosophila* que probablemente es nula (*apoLTP[excDG06206]*). Nuestro mutante es letal en la larva de primer instar, de manera similar a lo que sucede con el mutante generado en el laboratorio de S. Eaton y descrito anteriormente. También hemos observamos un fenotipo en intestino muy similar al descrito por S. Eaton (Palm et al., 2012), con una gran acumulación de lípidos en el intestino mutante que no ocurre en el silvestre. En el trabajo de S. Eaton se describe como el silenciamiento de *apoLTP* mediante un RNA interferente no altera la cantidad de lipoforina circulante, por lo tanto esta acumulación de lípidos en el intestino no se debe a esta razón.

Además del fenotipo de acumulación de lípidos en el intestino, nuestros datos indican que el LTP también se requiere durante la oogénesis para la entrada masiva de lípidos en el oocito. Estos datos concuerdan con experimentos realizados in vitro con ovariolas de *Bombyx mori*, en los cuales al inyectar en pupas anticuerpos contra LTP se veía una reducción en la cantidad

de lípidos en los ovarios de un 75% comparado con insectos a los cuales se les había inyectado suero (Jouni et al., 2003).

El silenciamiento del gen *apolipoforina* por medio de ARN interferente produce una acumulación de lípidos neutros en el intestino y una disminución de lípidos en los discos imaginales (Palm et al., 2012) y ovarios (J. Culi, no publicado). Este fenotipo indica la importancia central de la lipoforina en el metabolismo lipídico, quedando afectados todos los procesos de transporte, tanto la salida de lípidos neutros del intestino cómo su transporte y transferencia a ovarios y discos imaginales (Figura 35). El fenotipo de falta de LTP es similar al de ausencia de lipoforina, indicando que la función del LTP está estrechamente relacionada con la de la lipoforina (Figura 51). Sin embargo, existen también diferencias. En primer lugar, los mutantes nulos para la *apolipoforina* son letales embrionarios, mientras que los mutantes en *apoLTP* mueren en el primer instar larvario, indicando un requerimiento durante la embriogénesis de la lipoforina que no existe para el LTP. Asimismo, la reducción en la cantidad de TAG de los discos imaginales después de silenciar la *apolipoforina* es de un 60% mientras que sólo disminuye un 40% al silenciar *apoLTP* (Palm et al., 2012). Por otro lado, otros trabajos realizados en el laboratorio de S. Eaton han indicado que no todas las especies lipídicas requieren el LTP para su transferencia a la lipoforina. En particular, la falta de LTP disminuye la cantidad de DAG y de esteroides de la lipoforina, pero no así del fosfolípido más abundante, la fosfatidiletanolamina, que por tanto se puede cargar en la lipoforina de manera independiente al LTP. De acuerdo con ello, la composición de fosfolípidos en discos imaginales sólo se ve alterada al eliminar la lipoforina y no el LTP (Palm et al., 2012).

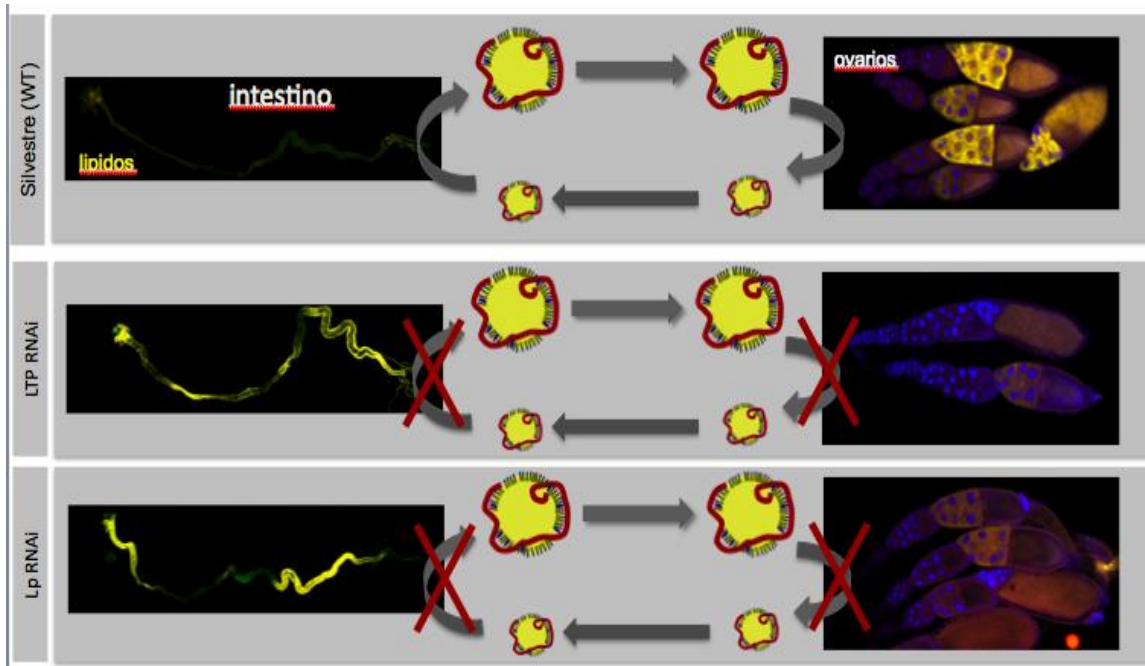


Figura 51: Imagen en la cual observamos la distribución de lípidos neutros tanto en intestinos como en ovarios de *Drosophila*, al silenciar ya sea la *apolipoforina* o el *apoLTP*. En animales silvestres observamos una importante acumulación de lípidos neutros en los ovarios y mínima en intestinos. Sin embargo al disminuir la cantidad de lipoforina o de LTP del organismo se observa cómo se acumulan lípidos neutros en el intestino y una ausencia casi total de estos en los ovarios. Los núcleos de los ovarios se tiñeron con DAPI y los lípidos neutros con Nile red. Las flechas representan la transferencia de lípidos y la circulación de la lipoforina.

### Interacción de los Receptores de Lipoforinas con el LTP. Significado biológico.

Nuestros datos han indicado por primera vez que el LTP es un ligando para los receptores de lipoforinas. Al estudiar la acumulación de LTP en diferentes tejidos tanto en un fondo genético silvestre como en fondo *Df(3R)lpr1/2*, una deficiencia que elimina los genes *lpr1* y *lpr2*, observamos una mayor cantidad de LTP en fondo silvestre. Esta diferencia es muy acusada para ovarios y discos imaginales y menor para el intestino, cuerpo graso y oenocitos,

todos ellos órganos que acumulan LTP (Figuras 40 y 41). Por tanto, los receptores de lipoforinas son fundamentales para la deposición del LTP tanto en discos imaginales como en ovarios. ¿Cuál es el papel de la acumulación de LTP en estos tejidos? Varias indicaciones sugieren que es una parte esencial del mecanismo de adquisición de lípidos. En primer lugar, hemos visto que únicamente un grupo de isoformas de los receptores de lipoforinas interaccionan con el LTP y median su acumulación en tejidos, para lo que se requiere del módulo LA-1 (Figura 41). Éstas son las mismas isoformas que median la adquisición de lípidos neutros (Parra-Peralbo and Culi, 2011), sugiriendo que los dos procesos están relacionados. En segundo lugar, como ya hemos discutido, experimentos in vitro realizados en otras especies de insectos sugieren que el LTP cataliza la transferencia de lípidos entre la lipoforina y varios tejidos. Por ello, es probable que la acumulación de LTP en las células promovida por los receptores de lipoforinas tenga esta función. Para demostrar inequívocamente el requerimiento de la interacción del LTP con los receptores de lipoforinas para la toma de lípidos deberíamos bloquear específicamente esta interacción mediante la mutagénesis ya sea del receptor de lipoforinas, sin alterar la unión a otros posible ligandos, o de ApoLTP y examinar el fenotipo resultante. Este experimento, muy complejo, no se ha realizado.

Por otro lado, parece claro que el LTP tiene funciones que son independientes de los receptores de lipoforinas. Observamos que el fenotipo resultante de eliminar el LTP es más fuerte que cuando eliminamos los receptores de lipoforinas. En el primer caso se produce letalidad larvaria mientras que los mutantes nulos para los receptores de lipoforinas son viables en homocigosis, si bien estériles. En segundo lugar, la transferencia de lípidos neutros desde el intestino a las lipoforinas no requiere de los receptores de lipoforinas pero si del LTP. Esto puede deberse a que los receptores de lipoforinas no jueguen ningún papel en este proceso o bien a la existencia de receptores redundantes. Al examinar el intestino en el doble mutante deficiente para ambos receptores de lipoforina (*Df(3R)lpr1/2*), vimos que el LTP disminuye pero no desaparece. Ello podría indicar la existencia de receptores redundantes.



Un posible candidato son los HSPGs que pueden interaccionar con lipoproteínas, tanto en mamíferos como en *Drosophila* (Eugster et al., 2007; MacArthur et al., 2007).

### **Modelo de interacción LTP-receptores de lipoforina en la toma de lípidos.**

Al iniciar esta tesis, nuestra hipótesis de trabajo era que los mecanismos moleculares que median la toma de lípidos en los discos imaginales y los ovarios de *Drosophila* eran equivalentes a los que median la hidrólisis extracelular de las lipoproteínas ricas en TAG en los capilares de vertebrados (Dallinga-Thie et al., 2010). Este modelo, basado en la conservación evolutiva entre especies, propondría que las lipoforinas son reclutadas a la membrana plasmática por los receptores de lipoforinas, que harían la función que en vertebrados desempeña GPIHBP1, el VLDLR y los HSPG. La transferencia de los lípidos a la célula ocurriría primero por la hidrólisis del DAG de las lipoforinas por una lipasa extracelular, equivalente a la lipasa de lipoproteínas de mamíferos, y el posterior transporte de los ácidos grasos resultantes a la célula mediante transportadores específicos. De hecho, se ha descrito que en oocitos de insecto, existe una lipasa capaz de hidrolizar el DAG de las lipoproteínas, generándose ácidos grasos libres (Kawooya and Law, 1988; Van Antwerpen et al., 1993; Van Antwerpen and Law, 1992). Estos ácidos grasos podrían ser transportados al interior celular gracias a transportadores de ácidos grasos los cuales están conservados en numerosos organismos, incluido *Drosophila* (Hirsch et al., 1998). Nuestros resultados no apoyan este modelo, ya que aunque no podemos descartar que lipasas y transportadores de ácidos grasos estén involucrados en la toma de lípidos, no los hemos identificado mediante nuestra aproximación bioquímica. Además, nuestros estudios funcionales no apoyan la participación de transportadores de ácidos grasos. Hemos visto que la sobreexpresión de una FATP, ya sea por si misma o junto a Lpr2E, no aumenta la cantidad de inclusiones lipídicas en las células de los discos imaginales. Ello sugiere que

estos transportadores no participan en el proceso, aunque otras interpretaciones son posibles. Por ejemplo, si la actividad de los FATP no fuera limitante en los discos silvestres, su sobreexpresión no tendría ninguna consecuencia.

Por el contrario, nuestra identificación del LTP como un ligando de los receptores de lipoforinas sugiere un modelo alternativo para la toma de lípidos, en el que la actividad catalítica del LTP es central. Proponemos un modelo en el cual el LTP cataliza la transferencia de lípidos desde la lipoforina a las células sin necesidad de endocitosis. Este modelo no requiere de la participación de lipasas extracelulares ni transportadores como CD36 o FATP. La lipoforina de la hemolinfa se uniría a los receptores de lipoforinas expresados en discos imaginales y ovarios. Igualmente, el LTP se uniría a estos receptores a través del dominio LA-1. La formación de este complejo proteico favorecería la delipidación de las lipoforinas por parte del LTP, que posteriormente transferiría su cargo de lípidos a la célula. Especulamos que el LTP podría transferir su cargo lipídico directamente a la bicapa lipídica de la membrana celular, donde quedaría incluido y rodeado de fosfolípidos. Esta actividad sería inversa a la catalizada por el MTP de vertebrados, una proteína con homología al LTP. El MTP es esencial para la biosíntesis y lipidación de las lipoproteínas ricas en TAG como los quilomicrones y VLDL. Se ha propuesto que el TAG recién sintetizados en el retículo endoplasmático (RE) se acumula entre las dos capas de la bicapa de fosfolípidos de la membrana del RE. El MTP transloca estos TAG embebidos en la bicapa al lumen del RE, formándose inclusiones lipídicas, las cuales se fusionan con partículas de ApoB48 para formar los quilomicrones, un proceso también catalizado por el MTP (Hussain et al., 2003; Lehner et al., 2012). Nosotros proponemos que el LTP realiza la función inversa, transferir lípidos neutros de la lipoforina a la bicapa lipídica de la membrana plasmática. Posteriormente las acumulaciones de DAG son probablemente procesadas enzimáticamente en la propia membrana ya que el DAG no puede acumularse a alta concentración en las células por resultar tóxico (figura 52).

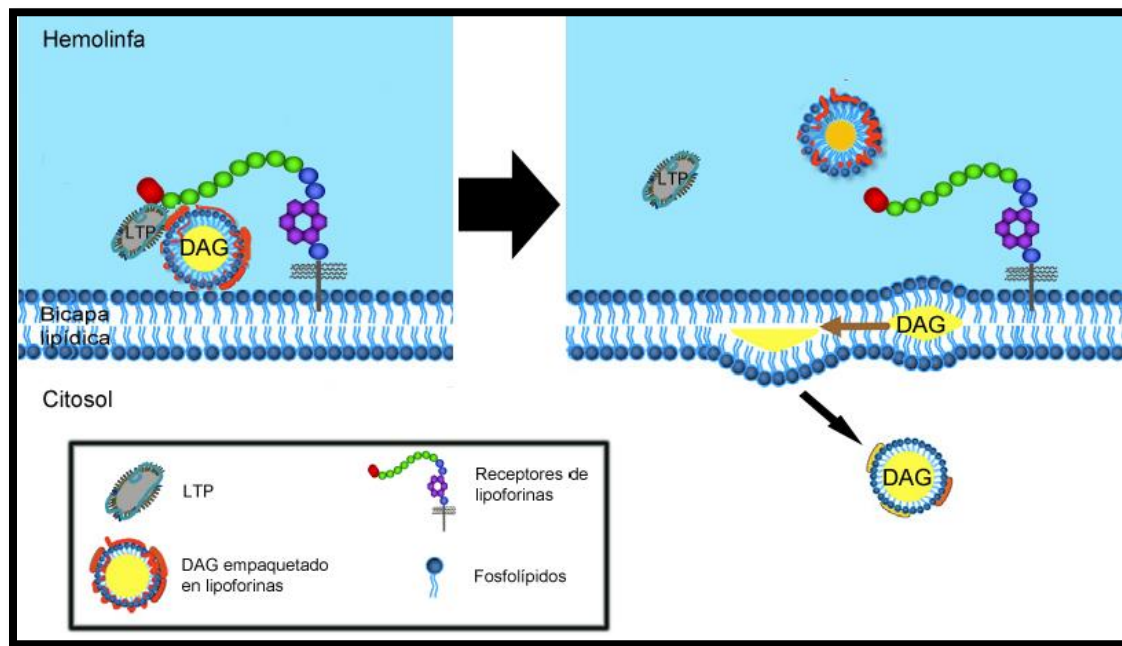


Figura 52: Modelo molecular para la toma de lípidos mediado por los receptores de lipoforinas en las células de los tejidos periféricos de *Drosophila*. Los receptores de lipoforinas se encuentran en la membrana celular, donde estabilizan por un lado a las lipoforinas y por otro al LTP gracias al dominio LA1 de los receptores de lipoforinas. Según el modelo que proponemos, el LTP facilitaría la separación del DAG transportado por las lipoforinas y su posterior inclusión en la membrana celular. Posteriormente, el DAG de la membrana se introduciría en la célula para su almacenaje o se usaría como sustrato energético.

# *Conclusiones*



- 1.- Es poco probable que lipasas o proteínas transportadoras de ácidos grasos participen en el proceso de toma de lípidos mediado por los receptores de lipoforinas en *Drosophila*, en contraste con lo que ocurre en mamíferos.
- 2.- La proteína CG15828 interacciona con alta afinidad con los receptores de lipoforinas y por tanto puede participar en la toma de lípidos en *Drosophila*.
- 3.- CG15828 se corresponde con ApoLTP, una lipoproteína descrita en otros insectos que puede catalizar in vitro la transferencia de lípidos entre lipoproteínas.
4. La ApoLTP pertenece a la familia de las Large Lipid Transfer Proteins (LLTP) que se caracterizan por tener un dominio de unión a lípidos tipo vitelogenina y a la que también pertenece la ApoB humana.
5. El LTP se sintetiza en el cuerpo graso, se secreta a la hemolinfa y se acumula en el intestino, discos imaginales, oenocitos y ovarios entre otros tejidos, todos ellos órganos relacionados con el metabolismo lipídico.
- 6.- La cantidad de LTP circulante no está regulado por mecanismos de retroalimentación.
7. En ausencia o disminución de la concentración de LTP, se acumulan lípidos neutros en el intestino y se reducen en los discos imaginales y en los ovarios. Ello indica que el LTP participa en el transporte de lípidos neutros.
- 8.- Los receptores de lipoforinas son esenciales para la estabilización del LTP en la membrana plasmática de discos imaginales y ovarios. Por tanto, el LTP es un

ligando para los receptores de lipoforinas in vivo y éstos son sus únicos receptores en estos tejidos.

9.- La interacción del LTP con los receptores de lipoforinas, su co-localización en discos imaginales y ovarios y su requerimiento para la acumulación de lípidos neutros en estos tejidos sugiere que el LTP, junto con los receptores de lipoforinas, forman parte de un mecanismo molecular para la adquisición celular de lípidos.

10.- No todas las isoformas de los receptores de lipoforinas interaccionan y estabilizan el LTP en la membrana. Sólo aquellas que median la toma de lípidos lo hacen.

11.- El módulo LA1 que se encuentra en las isoformas de los receptores de lipoforinas que median la toma de lípidos es esencial para la interacción y estabilización del LTP.





# *Bibliografía*



Augustus, A.S., Buchanan, J., Park, T.S., Hirata, K., Noh, H.L., Sun, J., Homma, S., D'Armiento, J., Abel, E.D., and Goldberg, I.J. (2006). Loss of lipoprotein lipase-derived fatty acids leads to increased cardiac glucose metabolism and heart dysfunction. *J Biol Chem* 281, 8716-8723.

Babin, P.J., Bogerd, J., Kooiman, F.P., Van Marrewijk, W.J., and Van der Horst, D.J. (1999). Apolipoprotein II/I, apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor. *J Mol Evol* 49, 150-160.

Baker, K.D., and Thummel, C.S. (2007). Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in *Drosophila*. *Cell Metab* 6, 257-266.

Beigneux, A.P., Davies, B.S., Gin, P., Weinstein, M.M., Farber, E., Qiao, X., Peale, F., Bunting, S., Walzem, R.L., Wong, J.S., *et al.* (2007). Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab* 5, 279-291.

Beigneux, A.P., Franssen, R., Bensadoun, A., Gin, P., Melford, K., Peter, J., Walzem, R.L., Weinstein, M.M., Davies, B.S., Kuivenhoven, J.A., *et al.* (2009). Chylomicronemia with a mutant GPIHBP1 (Q115P) that cannot bind lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 956-962.

Bensadoun, A. (1991). Lipoprotein lipase. *Annu Rev Nutr* 11, 217-237.

Bharucha, K.N. (2009). The epicurean fly: using *Drosophila melanogaster* to study metabolism. *Pediatr Res* 65, 132-137.

Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3312-3317.

Bishop, J.R., Schuksz, M., and Esko, J.D. (2007). Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446, 1030-1037.

Bishop, J.R., Stanford, K.I., and Esko, J.D. (2008). Heparan sulfate proteoglycans and triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 19, 307-313.

Blacklock, B.J., Smillie, M., and Ryan, R.O. (1992). Insect lipid transfer particle can facilitate net vectorial lipid transfer via a carrier-mediated mechanism. *J Biol Chem* 267, 14033-14037.

Bogerd, J., Babin, P.J., Kooiman, F.P., Andre, M., Ballagny, C., van Marrewijk, W.J., and van der Horst, D.J. (2000). Molecular characterization and gene expression in the eye of the apolipoprotein II/I precursor from *Locusta migratoria*. *J Comp Neurol* 427, 546-558.

Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.

Braun, J.E., and Severson, D.L. (1992). Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* 287 ( Pt 2), 337-347.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1979). Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3330-3337.

Canavoso, L.E., Jouni, Z.E., Karnas, K.J., Pennington, J.E., and Wells, M.A. (2001). Fat metabolism in insects. *Annu Rev Nutr* 21, 23-46.

Canavoso, L.E., and Wells, M.A. (2001). Role of lipid transfer particle in delivery of diacylglycerol from midgut to lipophorin in larval *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 31, 783-790.

Capurro, and Bianchi, d. (1990). Larval *Musca domestica* lipophorin biosynthesis. *Comp Biochem Physiol* 97B, 655 -659.

Coburn, C.T., Knapp, F.F., Jr., Febbraio, M., Beets, A.L., Silverstein, R.L., and Abumrad, N.A. (2000). Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem* 275, 32523-32529.

Culi, J., and Mann, R.S. (2003). Boca, an endoplasmic reticulum protein required for wingless signaling and trafficking of LDL receptor family members in *Drosophila*. *Cell* 112, 343-354.

Culi, J., Springer, T.A., and Mann, R.S. (2004). Boca-dependent maturation of beta-propeller/EGF modules in low-density lipoprotein receptor proteins. *EMBO J* 23, 1372-1380.

Curtiss, L.K., and Boisvert, W.A. (2000). Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 11, 243-251.

Chino, H., and Gilbert, L.I. (1964). Diglyceride Release from Insect Fat Body: A Possible Means of Lipid Transport. *Science* 143, 359-361.

Church, R.B., and Robertson, F.W. (1966). Biochemical analysis of genetic differences in the growth of *Drosophila*. *Genet Res* 7, 383-407.

Dallinga-Thie, G.M., Franssen, R., Mooij, H.L., Visser, M.E., Hassing, H.C., Peelman, F., Kastelein, J.J., Peterfy, M., and Nieuwdorp, M. (2010). The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis* 211, 1-8.

Dantuma, N.P., Potters, M., De Winther, M.P., Tensen, C.P., Kooiman, F.P., Bogerd, J., and Van der Horst, D.J. (1999). An insect homolog of the vertebrate very low density lipoprotein receptor mediates endocytosis of lipophorins. *J Lipid Res* 40, 973-978.

Davidson, N.O., and Shelness, G.S. (2000). APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu Rev Nutr* 20, 169-193.

Derewenda, Z.S. (1994). Structure and function of lipases. *Adv Protein Chem* 45, 1-52.

Diehl, P.A. (1975). Synthesis and Release of Hydrocarbons by Enocytes of Desert Locust, *Schistocerca-Gregaria*. *J insect physiol* 21, 1237-1246.

Drover, V.A., Nguyen, D.V., Bastie, C.C., Darlington, Y.F., Abumrad, N.A., Pessin, J.E., London, E., Sahoo, D., and Phillips, M.C. (2008). CD36 mediates both cellular uptake of very long chain fatty acids and their intestinal absorption in mice. *J Biol Chem* 283, 13108-13115.

Dziembowski, A., and Seraphin, B. (2004). Recent developments in the analysis of protein complexes. *FEBS Lett* 556, 1-6.

Eugster, C., Panakova, D., Mahmoud, A., and Eaton, S. (2007). Lipoprotein-heparan sulfate interactions in the Hh pathway. *Dev Cell* 13, 57-71.

Fan, Y.L., Zurek, L., Dykstra, M.J., and Schal, C. (2003). Hydrocarbon synthesis by enzymatically dissociated oenocytes of the abdominal integument of the German Cockroach, *Blattella germanica*. *Naturwissenschaften* 90, 121-126.

Farese, R.V., Jr., and Walther, T.C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139, 855-860.

fielding, C.J.F.a.P.E. (2008). Dynamics of lipoproteins transport in the circulatory system. In *biochemistry of lipids, lipoproteins and membrane*. EDVaJE Vance, Ed (BV Elsevier), 533-552.

Franssen R, V.M., Kuivenhoven JA, Kastelein JJP, Dallinga-Thie GM, Stroes, and ES. (2008). Role of lipoprotein lipase in triglyceride metabolism: potential therapeutic target. *Future Lipidol* 3, 385–397.

Gilbert, L.I., Rybczynski, R., and Warren, J.T. (2002). Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu Rev Entomol* 47, 883-916.

Gingras, A.C., Gstaiger, M., Raught, B., and Aebersold, R. (2007). Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 645-654.

Glatz, J.F., Luiken, J.J., and Bonen, A. (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev* 90, 367-417.

Goldberg, I.J. (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* 37, 693-707.

Goldberg, I.J., and Merkel, M. (2001). Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front Biosci* 6, D388-405.

Greenberg, A.S., Egan, J.J., Wek, S.A., Garty, N.B., Blanchette-Mackie, E.J., and Londos, C. (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem* 266, 11341-11346.

Griffin, L.D., Gong, W., Verot, L., and Mellon, S.H. (2004). Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. *Nat Med* 10, 704-711.

Grigliatti, T.A., Hall, L., Rosenbluth, R., and Suzuki, D.T. (1973). Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. XIV. A selection of immobile adults. *Mol Gen Genet* 120, 107-114.

Gronke, S., Mildner, A., Fellert, S., Tennagels, N., Petry, S., Muller, G., Jackle, H., and Kuhnlein, R.P. (2005). Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metab* 1, 323-330.

Gutierrez, E., Wiggins, D., Fielding, B., and Gould, A.P. (2007). Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature* 445, 275-280.

Hader, T., Muller, S., Aguilera, M., Eulenberg, K.G., Steuernagel, A., Ciossek, T., Kuhnlein, R.P., Lemaire, L., Fritsch, R., Dohrmann, C., *et al.* (2003). Control of triglyceride storage by a WD40/TPR-domain protein. *EMBO Rep* 4, 511-516.

Hagberg, C.E., Falkevall, A., Wang, X., Larsson, E., Huusko, J., Nilsson, I., van Meeteren, L.A., Samen, E., Lu, L., Vanwildemeersch, M., *et al.* (2010). Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* 464, 917-921.

Herz, J., and Bock, H.H. (2002). Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem* 71, 405-434.

Hirayama, Y., and Chino, H. (1990). Lipid transfer particle in locust hemolymph: purification and characterization. *J Lipid Res* 31, 793-799.

Hirsch, D., Stahl, A., and Lodish, H.F. (1998). A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8625-8629.

Holmquist, M. (2000). Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr Protein Pept Sci* 1, 209-235.

Horne, I., Haritos, V.S., and Oakeshott, J.G. (2009). Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. *Insect Biochem Mol Biol* 39, 547-567.

Huet, F., Lu, J.T., Myrick, K.V., Baugh, L.R., Crosby, M.A., and Gelbart, W.M. (2002). A deletion-generator compound element allows deletion saturation analysis for genomewide phenotypic annotation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9948-9953.

Hussain, M.M. (2001). Structural, biochemical and signaling properties of the low-density lipoprotein receptor gene family. *Front Biosci* 6, D417-428.



Hussain, M.M., Shi, J., and Dreizen, P. (2003). Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res* 44, 22-32.

Hussain, M.M., Strickland, D.K., and Bakillah, A. (1999). The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr* 19, 141-172.

Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y., and Yamamoto, D. (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 124, 761-771.

Jonas, A.a.P., M.C (2008). Lipoprotein structure. In *biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membrane*. EDVaJE Vance, Ed (BV Elsevier).

Jouni, Z.E., Takada, N., Gazard, J., Maekawa, H., Wells, M.A., and Tsuchida, K. (2003). Transfer of cholesterol and diacylglycerol from lipophorin to Bombyx mori ovarioles in vitro: role of the lipid transfer particle. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 145-153.

Kawooya, J.K., and Law, J.H. (1988). Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg. *J Biol Chem* 263, 8748-8753.

Kosaka, T., and Ikeda, K. (1983). Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, shibirets1. *J Cell Biol* 97, 499-507.

Kuhnlein, R.P. (2010). *Drosophila* as a lipotoxicity model organism--more than a promise? *Biochim Biophys Acta* 1801, 215-221.

Kuhnlein, R.P. (2011). The contribution of the *Drosophila* model to lipid droplet research. *Prog Lipid Res* 50, 348-356.

Kuhnlein, R.P. (2012). Lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. Lipid droplet-based storage fat metabolism in *Drosophila*. *J Lipid Res* 53, 1430-1436.

Lee, G., and Park, J.H. (2004). Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 311-323.

Leopold, P., and Perrimon, N. (2007). *Drosophila* and the genetics of the internal milieu. *Nature* 450, 186-188.

Levashina, E.A., Moita, L.F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M., and Kafatos, F.C. (2001). Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* 104, 709-718.

Lewis, S.E., Listenberger, L.L., Ory, D.S., and Schaffer, J.E. (2001). Membrane topology of the murine fatty acid transport protein 1. *J Biol Chem* 276, 37042-37050.

Liu, H., and Ryan, R.O. (1991). Role of lipid transfer particle in transformation of lipophorin in insect oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1085, 112-118.

Lobo, S., Wiczner, B.M., Smith, A.J., Hall, A.M., and Bernlohr, D.A. (2007). Fatty acid metabolism in adipocytes: functional analysis of fatty acid transport proteins 1 and 4. *J Lipid Res* 48, 609-620.

MacArthur, J.M., Bishop, J.R., Stanford, K.I., Wang, L., Bensadoun, A., Witztum, J.L., and Esko, J.D. (2007). Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *J Clin Invest* 117, 153-164.

Mahley, R.W., and Ji, Z.S. (1999). Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 40, 1-16.

Manchekar, M., Richardson, P.E., Forte, T.M., Datta, G., Segrest, J.P., and Dashti, N. (2004). Apolipoprotein B-containing lipoprotein particle assembly: lipid capacity of the nascent lipoprotein particle. *J Biol Chem* 279, 39757-39766.

Mann, C.J., Anderson, T.A., Read, J., Chester, S.A., Harrison, G.B., Kochl, S., Ritchie, P.J., Bradbury, P., Hussain, F.S., Amey, J., *et al.* (1999). The structure of vitellogenin provides a molecular model for the assembly and secretion of atherogenic lipoproteins. *J Mol Biol* 285, 391-408.

May, P., and Herz, J. (2003). LDL receptor-related proteins in neurodevelopment. *Traffic* 4, 291-301.

Narayanaswami, V., and Ryan, R.O. (2000). Molecular basis of exchangeable apolipoprotein function. *Biochim Biophys Acta* 1483, 15-36.

Nelson, R.E., Fessler, L.I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D.R., Olson, P.F., Parker, C.G., and Fessler, J.H. (1994). Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *EMBO J* 13, 3438-3447.

Nelliot, A., Bond, N., and Hoshizaki, D.K. (2006). Fat-body remodeling in *Drosophila melanogaster*. *Genesis* 44, 396-400.

Nordestgaard, B.G., Benn, M., Schnohr, P., and Tybjaerg-Hansen, A. (2007). Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 298, 299-308.

Osborne, J.C., Jr., Bengtsson-Olivecrona, G., Lee, N.S., and Olivecrona, T. (1985). Studies on inactivation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry* 24, 5606-5611.

Padmanabha, D., and Baker, K.D. (2014). *Drosophila* gains traction as a repurposed tool to investigate metabolism. *Trends Endocrinol Metab.*

Palm, W., Sampaio, J.L., Brankatschk, M., Carvalho, M., Mahmoud, A., Shevchenko, A., and Eaton, S. (2012). Lipoproteins in *Drosophila melanogaster*--assembly, function, and influence on tissue lipid composition. *PLoS Genet* 8, e1002828.

Panakova, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C., and Eaton, S. (2005). Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* 435, 58-65.

Parisi, M., Li, R., and Oliver, B. (2011). Lipid profiles of female and male *Drosophila*. *BMC Res Notes* 4, 198.

Parra-Peralbo, E., and Culi, J. (2011). *Drosophila* lipophorin receptors mediate the uptake of neutral lipids in oocytes and imaginal disc cells by an endocytosis-independent mechanism. *PLoS Genet* 7, e1001297.

Parthasarathy, N., Goldberg, I.J., Sivaram, P., Mulloy, B., Flory, D.M., and Wagner, W.D. (1994). Oligosaccharide sequences of endothelial cell surface heparan sulfate proteoglycan with affinity for lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 269, 22391-22396.

Parvy, J.P., Napal, L., Rubin, T., Poidevin, M., Perrin, L., Wicker-Thomas, C., and Montagne, J. (2012). *Drosophila melanogaster* Acetyl-CoA-carboxylase sustains a fatty acid-dependent remote signal to waterproof the respiratory system. *PLoS Genet* 8, e1002925.

Peterfy, M., Ben-Zeev, O., Mao, H.Z., Weissglas-Volkov, D., Aouizerat, B.E., Pullinger, C.R., Frost, P.H., Kane, J.P., Malloy, M.J., Reue, K., *et al.* (2007). Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat Genet* 39, 1483-1487.

Pho, D.B., Pennanec'h, M., and Jallon, J.M. (1996). Purification of adult *Drosophila melanogaster* lipophorin and its role in hydrocarbon transport. *Arch Insect Biochem Physiol* 31, 289-303.

Piek, T. (1964). Synthesis of Wax in the Honeybee (*Apis-Mellifera* L). *J Insect Physiol* 10, 563-572.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218-229.

Ren, G., Rudenko, G., Ludtke, S.J., Deisenhofer, J., Chiu, W., and Pownall, H.J. (2010). Model of human low-density lipoprotein and bound receptor based on cryoEM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1059-1064.

Richardson, P.E., Manchekar, M., Dashti, N., Jones, M.K., Beigneux, A., Young, S.G., Harvey, S.C., and Segrest, J.P. (2005). Assembly of lipoprotein particles containing apolipoprotein-B: structural model for the nascent lipoprotein particle. *Biophys J* 88, 2789-2800.

Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17, 1030-1032.

Rodenburg, K.W., and Van der Horst, D.J. (2005). Lipoprotein-mediated lipid transport in insects: analogy to the mammalian lipid carrier system and novel concepts for the functioning of LDL receptor family members. *Biochim Biophys Acta* 1736, 10-29.

Rohila, J.S., Chen, M., Cerny, R., and Fromm, M.E. (2004). Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J* 38, 172-181.

Romeo, S., Yin, W., Kozlitina, J., Pennacchio, L.A., Boerwinkle, E., Hobbs, H.H., and Cohen, J.C. (2009). Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. *J Clin Invest* 119, 70-79.

Rorth, P. (1998). Gal4 in the *Drosophila* female germline. *Mech Dev* 78, 113-118.

Rulifson, E.J., Kim, S.K., and Nusse, R. (2002). Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science* 296, 1118-1120.

Rusten, T.E., Lindmo, K., Juhasz, G., Sass, M., Seglen, P.O., Brech, A., and Stenmark, H. (2004). Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev Cell* 7, 179-192.

Ryan, R.O., Haunerland, N.H., Bowers, W.S., and Law, J.H. (1988a). Insect lipid transfer particle catalyzes diacylglycerol exchange between high-density and very-high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 962, 143-148.

Ryan, R.O., Prasad, S.V., Henriksen, E.J., Wells, M.A., and Law, J.H. (1986a). Lipoprotein interconversions in an insect, *Manduca sexta*. Evidence for a lipid transfer factor in the hemolymph. *J Biol Chem* 261, 563-568.

Ryan, R.O., Senthilathipan, K.R., Wells, M.A., and Law, J.H. (1988b). Facilitated diacylglycerol exchange between insect hemolymph lipophorins. Properties of *Manduca sexta* lipid transfer particle. *J Biol Chem* 263, 14140-14145.

Ryan, R.O., and van der Horst, D.J. (2000). Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Annu Rev Entomol* 45, 233-260.

Ryan, R.O., Wells, M.A., and Law, J.H. (1986b). Lipid transfer protein from *Manduca sexta* hemolymph. *Biochem Biophys Res Commun* 136, 260-265.

Scott, R.C., Schuldiner, O., and Neufeld, T.P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell* 7, 167-178.

Schlegel, A., and Stainier, D.Y. (2007). Lessons from "lower" organisms: what worms, flies, and zebrafish can teach us about human energy metabolism. *PLoS Genet* 3, e199.

Schumaker, V.N., Phillips, M.L., and Chatterton, J.E. (1994). Apolipoprotein B and low-density lipoprotein structure: implications for biosynthesis of triglyceride-rich lipoproteins. *Adv Protein Chem* 45, 205-248.

Segrest, J.P., Jones, M.K., and Dashti, N. (1999). N-terminal domain of apolipoprotein B has structural homology to lipovitellin and microsomal triglyceride transfer protein: a "lipid pocket" model for self-assembly of apob-containing lipoprotein particles. *J Lipid Res* 40, 1401-1416.

Segrest, J.P., Jones, M.K., De Loof, H., and Dashti, N. (2001). Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* 42, 1346-1367.

Segrest, J.P., Jones, M.K., Mishra, V.K., Anantharamaiah, G.M., and Garber, D.W. (1994). apoB-100 has a pentapartite structure composed of three amphipathic alpha-helical domains alternating with two amphipathic beta-strand domains. Detection by the computer program LOCATE. *Arterioscler Thromb* 14, 1674-1685.

Segrest, J.P., Jones, M.K., Mishra, V.K., Pierotti, V., Young, S.H., Boren, J., Innerarity, T.L., and Dashti, N. (1998). Apolipoprotein B-100: conservation of lipid-associating amphipathic secondary structural motifs in nine species of vertebrates. *J Lipid Res* 39, 85-102.

Sendak, R.A., Melford, K., Kao, A., and Bensadoun, A. (1998). Identification of the epitope of a monoclonal antibody that inhibits heparin binding of lipoprotein lipase: new evidence for a carboxyl-terminal heparin-binding domain. *J Lipid Res* 39, 633-646.

Shapiro, J.P., Law, J.H., and Wells, M.A. (1988). Lipid transport in insects. *Annu Rev Entomol* 33, 297-318.

Smolenaars, M.M., Kasperaitis, M.A., Richardson, P.E., Rodenburg, K.W., and Van der Horst, D.J. (2005). Biosynthesis and secretion of insect lipoprotein:

involvement of furin in cleavage of the apoB homolog, apolipophorin-II/I. *J Lipid Res* **46**, 412-421.

Smolenaars, M.M., Madsen, O., Rodenburg, K.W., and Van der Horst, D.J. (2007). Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily. *J Lipid Res* **48**, 489-502.

Sonnenburg, W.K., Yu, D., Lee, E.C., Xiong, W., Gololobov, G., Key, B., Gay, J., Wilganowski, N., Hu, Y., Zhao, S., *et al.* (2009). GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase and prevents its inhibition by angiopoietin-like 3 and angiopoietin-like 4. *J Lipid Res* **50**, 2421-2429.

Soulages, J.L., and Wells, M.A. (1994). Lipophorin: the structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insects. *Adv Protein Chem* **45**, 371-415.

Strickland, D.K., Gonias, S.L., and Argraves, W.S. (2002). Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 66-74.

Sukonina, V., Lookene, A., Olivecrona, T., and Olivecrona, G. (2006). Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17450-17455.

Takeuchi, N., and Chino, H. (1993). Lipid transfer particle in the hemolymph of the American cockroach: evidence for its capacity to transfer hydrocarbons between lipophorin particles. *J Lipid Res* **34**, 543-551.

Tao, N., Wagner, S.J., and Lublin, D.M. (1996). CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J Biol Chem* **271**, 22315-22320.

Teixeira, L., Rabouille, C., Rorth, P., Ephrussi, A., and Vanzo, N.F. (2003). *Drosophila* Perilipin/ADRP homologue Lsd2 regulates lipid metabolism. *Mech Dev* **120**, 1071-1081.



Tufail, M., and Takeda, M. (2009). Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *J Insect Physiol* 55, 87-103.

Van Antwerpen, R., Conway, R., and Law, J.H. (1993). Protein and lipoprotein uptake by developing oocytes of the hawkmoth *Manduca sexta*. An ultrastructural and immunocytochemical study. *Tissue & cell* 25, 205-218.

Van Antwerpen, R., and Law, J.H. (1992). Lipophorin lipase from the yolk of *Manduca sexta* eggs: identification and partial characterization. *Arch Insect Biochem Physiol* 20, 1-12.

van der Horst, D.J., van Hoof, D., van Marrewijk, W.J., and Rodenburg, K.W. (2002). Alternative lipid mobilization: the insect shuttle system. *Mol Cell Biochem* 239, 113-119.

Van Heusden, M.C., and Law, J.H. (1989). An insect lipid transfer particle promotes lipid loading from fat body to lipoprotein. *J Biol Chem* 264, 17287-17292.

Veraksa, A., Bauer, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Analyzing protein complexes in *Drosophila* with tandem affinity purification-mass spectrometry. *Dev Dyn* 232, 827-834.

Vereshchagina, N., and Wilson, C. (2006). Cytoplasmic activated protein kinase Akt regulates lipid-droplet accumulation in *Drosophila* nurse cells. *Development* 133, 4731-4735.

Wang, H., and Eckel, R.H. (2009). Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E271-288.

Weers, P.M., Van Marrewijk, W.J., Beenackers, A.M., and Van der Horst, D.J. (1993). Biosynthesis of locust lipophorin. Apolipophorins I and II originate from a common precursor. *J Biol Chem* 268, 4300-4303.

Weinstock, P.H., Bisgaier, C.L., Aalto-Setälä, K., Radner, H., Ramakrishnan, R., Levak-Frank, S., Essenburg, A.D., Zechner, R., and Breslow, J.L. (1995). Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. Mild hypertriglyceridemia with impaired very low density lipoprotein clearance in heterozygotes. *J Clin Invest* 96, 2555-2568.

Wigglesworth, V.B. (1949). The utilization of reserve substances in *Drosophila* during flight. *J Exp Biol* 26, 150-163, illust.

Williams, K.J. (2008). Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids. *J Clin Invest* 118, 3247-3259.

Willnow, T.E. (1998). Receptor-associated protein (RAP): a specialized chaperone for endocytic receptors. *Biol Chem* 379, 1025-1031.

Willnow, T.E. (1999). The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J Mol Med* 77, 306-315.

Wu, L.T., Hui, J.H., and Chu, K.H. (2013). Origin and evolution of yolk proteins: expansion and functional diversification of large lipid transfer protein superfamily. *Biol Reprod* 88, 102.

Young, S.G., Cham, C.M., Pitas, R.E., Burri, B.J., Connolly, A., Flynn, L., Pappu, A.S., Wong, J.S., Hamilton, R.L., and Farese, R.V., Jr. (1995). A genetic model for absent chylomicron formation: mice producing apolipoprotein B in the liver, but not in the intestine. *J Clin Invest* 96, 2932-2946.

Yun, H.K., Jouni, Z.E., and Wells, M.A. (2002). Characterization of cholesterol transport from midgut to fat body in *Manduca sexta* larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 1151-1158.